

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES
FARMACOLÓGICAS DE *Azadirachta indica* A. Juss.

MARIA RITA DE KÁSSIA COSTA DE FARIAS

RECIFE – PE
JUNHO, 2008

MARIA RITA DE KÁSSIA COSTA DE FARIAS

INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE
Azadirachta indica **A. Juss.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, do Departamento de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Avaliação e Obtenção de Produtos Bioativos e Naturais

Orientador(a): Prof^a Dr^a Ivone Antônia de Souza
Co-orientador(a): Prof^a Dr^a Fálba Bernadete Ramos dos Anjos

RECIFE – PE
JUNHO, 2008

Farias, Maria Rita de Kássia Costa de

Investigação das propriedades farmacológicas de *Azadirachta indica* A. Juss / Maria Rita de Kássia Costa de Farias. – Recife: O Autor, 2008.

vi, 70 folhas. il: fig., graf., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2008.

Inclui bibliografia.

1. Propriedades farmacológicas. 2. *Azadirachta indica* A. Juss.

I.Título.

615.2

615.1

CDU (2.ed.)

CDD (22.ed.)

UFPE

CCS2008-079



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Recife, 05 de junho de 2008.

Dissertação de Mestrado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 05 de junho de 2008 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Ivone Antonia de Souza (Deptº de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: Ivone Antonia de Souza

EXAMINADOR INTERNO: Profa. Dra. Jane Sheila Higino (Deptº de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: Jane Sheila Higino

EXAMINADOR EXTERNO: Profa. Dra. Fálba Bernadete Ramos dos Anjos (Deptº de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco).

Assinatura: Fálba Bernadete Ramos dos Anjos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REITOR

Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiros

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Marco Antônio de Andrade Coelho Gueiros

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Jane Sheila Higino

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Samuel Daniel de Sousa

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Pedro José Rolim Neto

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Beate Seagesser Santos

"E umas das coisas que aprendi é que se deve viver apesar de. Apesar de, se deve comer. Apesar de, se deve amar. Apesar de, se deve morrer. Inclusive muitas vezes é o próprio apesar de que nos empurra para frente. Foi o apesar de que me deu uma angústia que insatisfeita foi criadora de minha própria vida."

Clarice Lispector

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Eliete Costa de Farias e a todos os meus familiares. A vocês minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o grande responsável pela finalização deste trabalho, que me iluminou e deu coragem nos momentos mais difíceis. É dele a vitória.

À minha mãe que sempre me incentivou a estudar e por todos os momentos de dedicação e carinho.

A todos os meus familiares por toda dedicação e pelo apoio nos momentos de dificuldades.

A minha orientadora professora Ivone de Souza pela paciência, carinho pelo seu incentivo, mas também pela a oportunidade de desenvolver o presente trabalho que foi um grande aprendizado.

A minha co-orientadora professora Fálba Bernadete pela sua atenção e pela ajuda que foi de grande importância, desde a época da graduação.

Ao professor George Jimenez (UFRPE) que colaborou com alguns experimentos e pelos seus conselhos que foram de grande importância.

A Dr^a Rita Pereira e a Carlos (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária) e a professora Suzene Izídio (UFRPE) pela ajuda na coleta e identificação do vegetal.

A professora Glória Duarte e a técnica Rejane Silva (Dept de Fisiologia e Farmacologia) a professora Edna Sales (Dept de Patologia), técnica Maria de Fátima e Edna da Silva (Dept de Histologia e Embriologia) e a Mariana (Aggeu Magalhães) pelo auxílio e orientação.

Aos novos amigos que adquiri durante os dois anos de pós-graduação: Ana Ruth Sampaio, Isla Vanessa, Aldo César, Ferreira, Renata Freitas, Eliane Leite, Sérgio Nóbrega pelo apoio incondicional, principalmente nos finais de semana.

As minhas amigas Aline e Tarciana pelos grandes momentos que passamos durante os quatro anos de graduação.

As minhas Amigas de longa data Renata, Jacqueline e Thayssa pelos grandes momentos de alegrias e muitas risadas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	II
LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 ESTUDO SOBRE <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	6
2.1.1 BOTÂNICO.....	6
2.1.2 FARMACOLÓGICO.....	8
2.1.3 TOXICOLÓGICO.....	8
2.1.4 FITOQUÍMICO.....	9
2.2 TOXICIDADE AGUDA.....	11
2.3 INFLAMAÇÃO.....	12
2.4 CÂNCER.....	13
2.4.1 CARCINOMA.....	13
2.4.2 SARCOMA.....	14
3 OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL.....	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
ARTIGO I: AVALIAÇÃO DA TOXIDADE AGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	18
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
INTRODUÇÃO.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	20
RESULTADOS.....	22
DISCUSSÃO.....	23
CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
ARTIGO II: ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS <i>Azadirachta indica</i> A. Juss . EM <i>Rattus novergicus</i>	33
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
INTRODUÇÃO.....	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
RESULTADOS.....	37
DISCUSSÃO.....	38
CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
ARTIGO III: EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Azadirachta indica</i> A. Juss. FRENTE AO CARCINOMA DE EHRLICH E SARCOMA 180 EM CAMUNDONGOS ALBINOS (<i>Mus musculus</i>).	45
RESUMO.....	45
ABSTRACT.....	46
INTRODUÇÃO.....	46
MATERIAL E MÉTODOS.....	47
RESULTADOS.....	50
DISCUSSÃO.....	51
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
7. CONCLUSÕES	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA = Análise Variância

CEEA = Comitê de ética em experimentação animal

COBEA = Colégio Brasileiro de Experimentação animal

CL₅₀ = Concentração Letal de 50%

COX – 2 = Cicloxigenase do tipo 2

DL₅₀ = Dose Letal de 50%

e.p.m = erro padrão

EHA = Extrato hidroalcoólico

IPA = Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária

mg/kg = miligrama por quilograma

OMS = Organização Mundial de Saúde

% = percentagem

v.o = via oral

v.i = via intraperitoneal

TWI% = Percentual de inibição tumoral

°C = Graus Celsius

µg/mL = micrograma por mililitro

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	07
Figura 2. Parte aérea da espécie <i>Azadirachta indica</i> A. Juss <i>Azadirachta indica</i> A. folhas alternas; B. inflorescência branca ou creme.....	07
Figura 3. Fruto do tipo baga de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.....	08
Figura 4. Azadiractina, composto presente nas espécies da família Meliaceae.....	10
Figura 5 – Triterpenos tetracíclicos isolados de <i>Azadirachta indica</i> . (A) [24,25,26,27- tetranorapotirucalla-6 α -metoxi-7 α acetoxi-1,14dien-3,16-dione-21-al] e (B) [24,25,26,27- tetranorapotirucalla - 6 α -hidroxi, 11 α -metoxi, 7 α , 12 α -diacetoxi 1,14,20(22)-trien-3- one.....	10

ARTIGO I

Gráfico 1. Porcentagem de vivos acumulados X concentração do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Azadirachta indica</i> em <i>Artemia salina</i>	31
--	----

ARTIGO II

Gráfico 1. Efeito do extrato hidroalcoólico da folhas de <i>A. indica</i> nas doses de 250 (extrato 1), 500 (extrato 2) e 1000 (extrato 3), administrados por via oral, no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratas Wistar (<i>Rattus novergicus</i>).....	43
--	----

ARTIGO III

Gráfico 1. Média dos pesos dos tumores para o Carcinoma de Ehrlich.....	57
Gráfico 2. Média dos pesos dos tumores para o Sarcoma 180.....	57

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1. Efeitos toxicológicos provocados pelas doses do extrato hidroalcoólico das folhas de *Azadirachta indica* administradas em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*).....30

ARTIGO III

Tabela 1. Descrição macroscópica dos tumores Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180, nos grupos controle, padrão e tratados com extrato das folhas de *A. indica* nas doses 250, 500 e 1000mg/kg.....58

RESUMO

A família Meliaceae compreende 50 gêneros que estão distribuídos predominantemente nos trópicos de todo mundo. São plantas geralmente arbóreas, as flores são pequenas em inflorescência, hermafroditas. A espécie *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida popularmente por nim e amargosa é originária da Ásia. Diferentes partes da planta apresentam propriedades medicinais como atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica, antidiabética, antiinflamatória, antiséptica, contra doenças de pele, anti-úlceras e antitumoral. O nim apresenta atividade contra insetos causando repelência e atraso no desenvolvimento. Este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade aguda (CL_{50} e DL_{50}) e as atividades farmacológicas (antiinflamatória e antitumoral) em roedores do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica*. Foram realizados ensaios de toxicidade aguda, por via oral, observação das alterações comportamentais resultantes da administração de cada dose. Os animais tratados apresentaram reações tóxicas, sendo comportamentais estimulantes os efeitos mais pronunciados. Em todas as doses administradas não houve óbito dos animais. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que o extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* possui baixa toxicidade quando administrado por via oral. Também foi avaliada a concentração letal 50% (CL_{50}) em larvas de *Artemia salina* e o valor encontrado da CL_{50} foi de 617,25537 $\mu\text{g/ml}$ indicando que o extrato possui toxicidade moderada em larvas de *Artemia salina*. Na avaliação da atividade antiinflamatória foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos, com administração por via oral. Os resultados obtidos indicam que o extrato das folhas de *A. indica* apresenta atividade edematogênica, sendo capaz de aumentar o tamanho do edema durante o processo inflamatório. No estudo da atividade antitumoral, o extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* foi analisado frente às linhagens Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180. O extrato produziu uma redução dos tumores, com 63,8% e 18,01% (não significativa) de inibição tumoral para os animais portadores de Carcinoma de Ehrlich tratados com doses de 250 e 500mg/kg/v.o respectivamente e para dose de 1000mg/kg/v.o houve um aumento não significativo dos pesos dos tumores. Para os animais portadores de Sarcoma 180 não foi observada inibição tumoral significativa para as doses de 250, 500 e 1000mg/kg/v.o.

Unitermos: Meliaceae, *Azadirachta indica*, Toxicidade aguda, DL_{50} , CL_{50} , Atividade antiinflamatória, Sarcoma 180, Carcinoma de Ehrlich.

ABSTRACT

The family Meliaceae there is fifty genus that distributed in tropics already the world. Is a plant port tree, small flowers. *Azadirachta indica* is known popularly by nim, amargosa is a plant native to Asian. Different part of this plant have been reported to possess medicinal properties like antiviral, antibacterial, antifungal, antidiabetic, anti-inflammatory, antiseptic, curing of skin diseases, antiulcer, antineoplastic and pest-control agent. The compounds isolated from *A. indica* have been demonstrated saponinas, triterpenes, tannins, alkaloids, flavonoids, coumarin, proteins and sugars. The objective of this work was to evaluate the toxicity and the pharmacological activities (anti-inflammatory and antineoplastic) in rodents of leaves of the *A. indica*. Acute toxicity assays were accomplished, by oral administration, with notification of the alterations in the behavior's reactions that were resulting of the administration of each dose. The treated animals presented toxic reactions, and the behavior's reaction stimulants were the most pronounced effects. Administration of leaves of extract *A. indica* did not produce died of mice. These data suggest that the hydroalcoholic leaf extract of *Azadirachta indica* A. Juss showed low toxicity in mice (*Mus musculus*). The LC₅₀ (Lethal Concentration 50%) was conducted using *Artemia salina* larvae as bioindicator. The mean LC₅₀ related to *A. salina* larvae attained 617,25537 µg/ml. These data suggest that the hydroalcoholic leaf extract of *Azadirachta indica* A. Juss showed toxicity moderate in *Artemia salina*. In the evaluation of the anti-inflammatory activity was used a carrageenan-induced by rat paw model with oral administration of the extract. The found results presented indicative that extract of leaves of *A. indica* increased significant of the volume of edema, thus suggesting a possible edematogenic effects, in doses administrated (250, 500 and 1000mg/kg/v.o). In relation to antineoplastic activity, was analysed by the tumor cells lines Ehrlich's Carcinoma and Sarcoma 180. The extract produced a not significant reduction of the tumors, with 63,8% (250mg/kg) and 18,0%(500mg/kg) of tumoral inhibition percentage, for dose 1000 mg/kg/v.o was observe increase not significant of tumors for the Ehrlich's Carcinoma. For the bearers animals of the Sarcoma 180 didn't observe tumoral inhibition significant with dose of 250mg/kg, 500 and 1000mg/kg/v.o.

Keywords: Meliaceae, *Azadirachta indica*, Acute toxicity, LD₅₀, LC₅₀, edematogenic Activity, Sarcoma 180, Ehrlich's Carcinoma.

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

As propriedades químicas das plantas e o seu potencial diferenciado vêm caracterizando estes organismos como possuidores de atividade medicamentosa e tóxica, isto é dependendo da forma como são usadas é da intensidade (SAUVIAT, 1977, LARINI, 1997).

Desde a antiguidade povos primitivos faziam uso do conhecimento das plantas, e através de tentativa e erro, procuravam amenizar os males acometidos (HILL, 1972, PANIZZA, 2002). Os primeiros estudos datam do ano 3000 a.C., no Egito antigo, no qual foram catalogadas nos papiros egípcios cerca de 500 plantas medicinais dentre outras a menta, alecrim, camomila, absinto, babosa, tomilho (FITOTERÁPICO, 2005).

A cultura grega antiga muito contribuiu para o desenvolvimento da farmácia e das drogas. A influência de Galeno (130 – 201 d.C) na medicina persistiu até os anos de 1500 e ainda pode ser sentida hoje com emprego de misturas herbáticas. Já os romanos organizaram e regularizaram a prática médica incluindo o uso de drogas. Teofrastos (372 – 287 a. C) relacionou tudo que era conhecido sobre plantas medicinais e Discorides (57 d.C), o cirurgião de Nero, utilizou esta lista como base para o compendio de substâncias utilizadas como medicamento que descreveu aproximadamente 500 plantas e como preparar remédios a partir delas (DAVID; DAVID, 2002).

Substâncias naturais oriundas de algumas espécies de plantas foram caracterizadas como tóxicas, por exemplo, aquelas pertencentes à família Solanácea que eram utilizadas em envenenamentos e rituais de magias na Idade Antiga, destacando-se, *Mandragora officinarum*, *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger*, assim como também, *Nicotiana tabacum*, *Podophyllum peltatum*, *Lophophora williamsii*, que eram usadas como “**Soro da Verdade**” na Segunda Guerra Mundial e na Guerra da Coreia (FREEDMAM, 1960, SILVA, 2002). Além disso, há relatos de que Cleópatra fez uso da *Atropa* e *Hyoscyamus*, quando decidiu se suicidar (SILVA, 2002).

No Brasil, considerando a diversidade das espécies vegetais, bem como a riqueza etno-cultural, as plantas medicinais ocupam posição de destaque no tratamento de doenças. Possibilitando deste modo o resgate e a preservação dos saberes populares nas comunidades (AGRA,1996, GARLET; IRGANG, 2001).

O interesse no uso de plantas medicinais deve-se principalmente ao fator econômico, já que os medicamentos sintéticos são de alto custo e de difícil aquisição. Por outro lado, deve-se considerar a facilidade de acesso da população a estas plantas, que são comercializadas livremente em mercados públicos, além de serem cultivadas em locais que disponham de condições mínimas necessárias (FITOTERÁPICO, 2005).

A biodiversidade no país abriga mais de 15% do total de organismos existentes no planeta. Aproximadamente 22% das plantas floríferas ocorrem na Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (PAVAN-FRUEHAUF, 2000). Estima-se que cerca de 50% das 200.000 espécies vegetais que possam existir no Brasil possuam propriedades terapêuticas (MARTINS et al, 1998). Sabe-se, também, que todas as possibilidades de cura, de prevenção e manutenção da saúde se encontram na natureza (ALZURAGAY; ALZUGARAY, 1983). Ribeiro (1987) destaca que das 60.000 espécies brasileiras identificadas, 880 já foram investigadas em algum tipo de estudo químico.

Nos países em desenvolvimento, bem como nos mais desenvolvidos, o estímulo ao consumo de produtos naturais aumenta diariamente, prometendo saúde e vida longa, com base no argumento de que plantas usadas há milênios são seguras para a população. (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005).

Dados da organização mundial de Saúde (OMS) demonstram que cerca de 80% da população mundial já fez uso de alguma planta considerada medicinal a fim de aliviar algum de seus males (CARVALHO; ALMANÇA, 2003, FITOTERÁPICO, 2005).

Nesse contexto, estudos sobre a medicina tradicional vêm ganhando destaque nas áreas dos agentes anticancerígenos, antimicrobianos, antivirais usados nas doenças infecciosas que

representam 51%, 78%, 71% respectivamente dos fármacos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) no período de 1983-1994, além disso, aproximadamente 119 substâncias químicas extraídas de cerca de 90 espécies de plantas superiores são utilizadas na medicina (SILVA, 2002).

No estudo sistemático das plantas é necessário o reconhecimento da espécie, princípios ativos e propriedades farmacológicas (MATOS, 1989, SILVA, 2002). Os princípios bioativos, geralmente estão presentes nos órgãos de reserva da planta, principalmente nas raízes e sementes, e em uma escala menor nas folhas, cascas, madeira ou outras partes da planta. A quantidade total de substâncias químicas presentes em qualquer órgão particular é tão pequena que é difícil atribuir qualquer significado biológico a isso. Deve haver uma ligeira função de proteção, mas, provavelmente esses princípios, que são tão valiosos ao homem no tratamento de doenças, são meramente produtos de excreção do metabolismo da planta (HILL, 1972, SCHULTZ, 1984).

2. Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTUDO SOBRE *Azadirachta indica* A. Juss

2.1.1 BOTÂNICO

A família Meliaceae compreende 50 gêneros que estão distribuídos predominantemente nos trópicos de todo mundo (SCHULTZ, 1984, JOLY, 2002). São plantas geralmente arbóreas, com folhas alternas compostas e grandes. As flores são pequenas em inflorescência, hermafroditas e de simetria radial; frutos em geral secos e as sementes apresentam arilo ou são aladas. (SCHULTZ, 1984, JOLY, 2002).

Dentre as espécies existentes no Brasil podem-se destacar os gêneros *Cabralea*, *Cedrela*, *Guarea*, *Trichilia*, *Melia* e *Azadirachta* (NEEM, 2008).

O gênero *Azadirachta* possui uma única espécie, *Azadirachta indica* A. Juss que é popularmente conhecida como Nim, amargosa (Figura 1). O nim é uma planta de origem asiática, de porte arbóreo, que pode alcançar de 10 a 20 m de altura, com tronco marrom-avermelhado, duro e resistente. As folhas são alternadas, com frequência aglomerada nos extremos dos ramos simples e sem estípulas e com folíolos de coloração verde-clara intensa (Figura 2A) (SODEPAZ, 2006). As flores são hermafroditas, brancas ou de cor creme e aromáticas, reunidas em inflorescências densas (Figura 2B). O fruto é uma baga ovalada que apresenta cor verde-clara (Figura 3) (SODEPAZ, 2006).

Em vários países, incluindo o Brasil, essa árvore tem sido estudada para fornecer produtos alternativos aos agrotóxicos, como extratos de frutos, sementes, ramos e folhas, e para controlar pragas em culturas onde o uso de agrotóxico não é permitido, como no caso dos cultivos orgânicos (AZADIRACHTA INDICA, 2004). Além disso, algumas pesquisas vêm mostrando que o nim é uma planta medicinal que pode ser usada como anti-séptico, tônico, vermífugo, na cura da diabetes,

malária, problemas dermatológicos, combate a sarna, pulga. (CHATTOPADHYAY, 1997; MARTINEZ, 2002; WINKALER *et al.*, 2007).

No Brasil, o nim pode ser encontrado nos parques e jardins públicos como planta ornamental e de sombra (CÔRREA, 1984, JOLY, 2002, BALMÉ; SARZANA, 2004, SIMÕES *et al.*, 2004).



Figura 1. Aspecto geral da *Azadirachta indica* A. Juss



Figura 2. Parte aérea da espécie *Azadirachta indica* A. Juss. **A.** folhas alternas; **B.** inflorescência branca ou creme.



Figura 3. Fruto do tipo baga de *Azadirachta indica* A. Juss

2.1.2 FARMACOLÓGICO

Segundo MARTINEZ (2002), *A. indica* a. Juss é conhecida há 5.000 anos e apresenta ação contra mais de 430 espécies de pragas que ocorrem em diversos países, causando múltiplos efeitos, tais como: repelência, interrupção do desenvolvimento e da ecdise, atraso no desenvolvimento, redução na fertilidade e fecundidade, e várias outras alterações no comportamento e na fisiologia dos insetos que podem levá-los a morte.

A espécie *A. indica* A. Juss possui atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica (ISMAN *et al.*, 1990; HARIKRISHMAN *et al.*, 2003), antidiabética e antiinflamatória (CHATTOPADHYAY, 1997), antiséptica, contra doenças de pele (MARTINEZ, 2002, WINKALER *et al.*, 2007), anti - úlcera (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2004) e antitumoral (DASGUPTA *et al.*, 2004, KUMAR *et al.*, 2006) .

2.1.3 TOXICOLÓGICO

Uma peculiaridade sobre estes organismos é que muitas espécies são ornamentais e normalmente possuem frutos e flores coloridos e cheiro forte que acaba despertando a curiosidade das pessoas desavisadas, principalmente, as crianças que ingenuamente costumam usá-las em

brincadeiras infantis (BANCO DE DADOS DO HORTO DE PLANTAS MEDICINAIS DA UFC, 1986, MATOS, 1989, WINCKELMAN *et al.*, 2000, SIMÕES *et al.*, 2004).

Segundo Thakurta *et al* (2007), camundongos albinos Swiss tratados com folhas *A. indica* (1800 mg/kg/v.o) não apresentaram efeitos tóxicos e não houve óbito. Também foi observado a ausência de efeito tóxicos em gatos tratados com extrato hidroalcoólico das folhas de nim, na dose de 1000mg/kg/i.p (CHATTOPADHYAY, 1997).

2.1.4 FITOQUÍMICO

Neste gênero foi identificado um liminóide conhecido como azadiractina (figura 4). Os liminóides são conhecidos pelo seu sabor amargo e por apresentarem atividades contra insetos, seja interferindo no crescimento ou na alimentação (AZADIRACHTA INDICA, 2004, DANTAS *et al.*, 2000, SIMÕES *et al.*, 2004; SENTHIL *et al.*, 2006).

Segundo Ross (2003), a *A. indica* A. Juss contém alcalóides, taninos, cumarinas, proteínas, flavonóides, saponinas e açúcares. Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de fenóis, triterpenos e saponinas no extrato da casca de nim. (SUBRAMANIAN; LAKSHMANAN, 1996).

Siddiqui *et al* (2004), isolaram das folhas de *A. indica* dois novos triterpenos tetracíclicos: [24,25,26,27-tetranorapotirucalla-6 α -metoxi-7 α acetoxi-1,14dien-3,16-dione-21-al] e [24,25,26,27-tetranorapotirucalla - 6 α -hidroxi, 11 α -metoxi, 7 α , 12 α -diacetoxi 1,14,20(22)-trien-3-one] (figura 5). O sreennig cromatográfico do extrato metanólico das folhas de *A. indica* demonstrou a presença de nimocinol e isomeldenin.

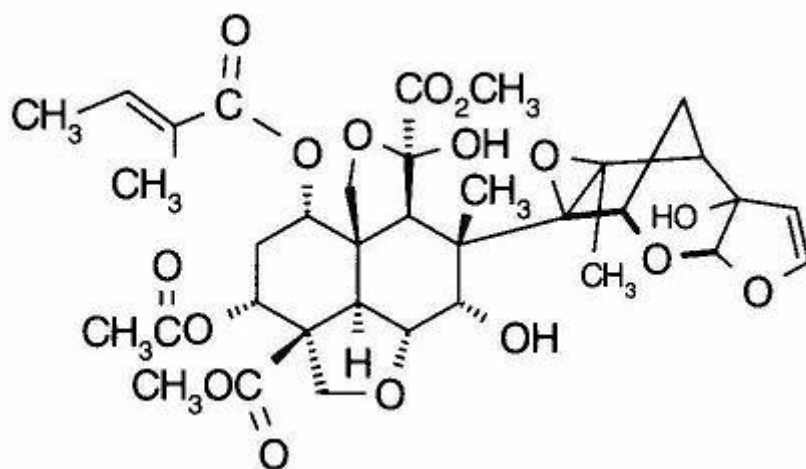


Figura 4 – Azadiractina, composto presente nas espécies da família Meliaceae. (Fonte: Simões, 2004).

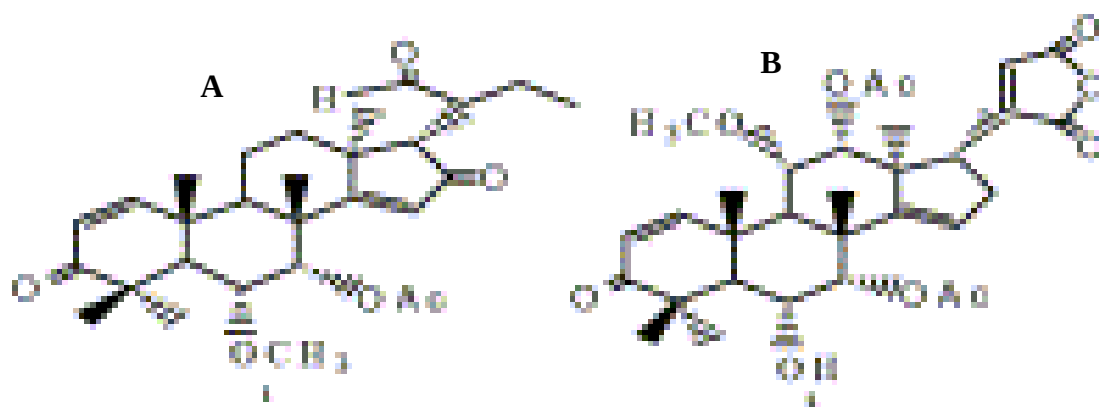


Figura 5 - Triterpenos tetracíclicos isolados de *Azadirachta indica*. **(A)** [24,25,26,27-tetranorapotirucalla-6 α -metoxi-7 α acetoxi-1,14dien-3,16-dione-21-al] e **(B)** [24,25,26,27-tetranorapotirucalla - 6 α -hidroxi, 11 α -metoxi, 7 α , 12 α –diacetoxi 1,14,20(22)-trien-3-one]. (Fonte: Siddiqui et al., 2004).

2.2 TOXICIDADE AGUDA

A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública, entretanto, muitas dessas plantas têm seu potencial tóxico completamente desconhecido (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005).

Algumas precauções devem ser tomadas no preparo de ervas, tais como, observar a dosagem, à parte vegetal indicada, a frequência e a forma de uso. A dosagem pode, às vezes, ser medicinal em pequenas quantidades ou tóxica em grandes quantidades podendo causar alergia e intoxicações (MATOS, 1989, LORENZI; MATOS, 2002). Portanto, uma planta medicinal para ser considerado medicamento, deve ser previamente validada, sua ação e sua toxicidade devem ser comprovadas cientificamente (SIMÕES *et al.*, 2004).

Os testes toxicológicos são realizados para analisar as condições em que as substâncias químicas produzem efeitos tóxicos, qual a natureza desses efeitos e quais os níveis seguros de exposição (LOOMIS; JAYES, 1996).

O teste de toxicidade aguda é realizado antes dos ensaios farmacológicos e representa uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas de um fitoterápico. Nos ensaios de toxicidade, as espécies mais utilizadas são camundongos e ratos machos e fêmeas, embora em certos casos também sejam utilizados animais maiores como coelhos e cães (KLASSEN *et al.*, 1996).

No estudo da toxicidade aguda os animais são tratados uma única vez ou com doses parceladas em período não superior a 24 horas com a substância teste. Os resultados são observados logo em seguida e permitirá conhecer a espécie mais sensível, as alterações comportamentais, os sinais que precedem a morte, as alterações hematológicas e bioquímicas e o índice de letalidade (SIMÕES *et al.*, 2004).

A relação binômica dose-efeito letal é estimada pela dose letal 50%, mais conhecida como DL₅₀(BARROS; DAVINO, 2003).

2.3 INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório é fundamental para defesa do organismo e tem por objetivo localizar a região afetada, eliminar o agente agressor e remover os tecidos degenerados, preparando a região acometida para a reparação. Contudo, em algumas doenças, a resposta inflamatória torna-se exagerada, persistindo sem qualquer benefício aparente (SILVA; CARVALHO, 2004, SIQUEIRA; DANTAS, 2000).

A inflamação se caracteriza por uma reação local associada com sintomas conhecidos desde a antiguidade, de dor, edema, rubor e calor. Além disso, também são observados eventos, como aumento da permeabilidade vascular e aumento da migração de granulócitos e monócitos (ANDRADE *et al.*, 2007).

O processo inflamatório está dividido em três fases: inflamação aguda, resposta imune e inflamação crônica. Na inflamação aguda ocorre liberação de histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos, e normalmente ocorre antes do desenvolvimento da resposta imune. A resposta imune acontece, quando as células são ativadas em resposta a presença de organismo estranho. Na inflamação crônica envolve a liberação de mediadores como interferon e interleucinas que não são proeminentes na resposta imune (SILVA, 2002).

Atualmente, diferentes abordagens terapêuticas têm sido usadas a fim de controlar os múltiplos sinais e sintomas desencadeados pela resposta inflamatória. Entre os fármacos mais usados pode-se citar: os antiinflamatórios não esteróides (AINES), analgésicos opióides, os antagonistas α_2 -adrenérgicos, os anti-epiléticos e os antidepressivos (BERTOLLO, 2006).

Os antiinflamatórios podem atuar na diminuição da liberação de ácido araquidônico, impedindo a liberação de prostaglandinas e na inativação da enzima ciclooxigenase (COX -2)

(SILVA, 2002, GOODMAN; GILAMAN, 2003). Apesar das diversas fontes terapêuticas, os agentes antiinflamatórios podem apresentar vários efeitos colaterais. Vários estudos estão sendo realizados na tentativa de descobrir medicamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais (SILVA; CARVALHO, 2004).

2.4 CÂNCER

Os primeiros relatos de ocorrência de câncer em seres humanos datam do Egito antigo por volta de 1500 a.c e são referentes à descrição de úlceras cutâneas resistentes a tratamentos (COWLDY, 1955).

Atualmente, o termo câncer é usado para designar neoplasias malignas, doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas. Existem diversos tipos de câncer que correspondem aos vários sistemas de células do corpo, aos quais se diferenciam pela capacidade de invasão dos tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (DE ALMEIDA *et al.* , 2005).

As neoplasias, tanto benignas quanto malignas, são doenças genéticas cujas mutações que lhe dão origem podem ser hereditariamente transmitidas pela linhagem germinativa ou adquiridas pelos tecidos somáticos (ISSELBACHER *et al.*, 1995).

De acordo com Alberts *et al* (1997), cânceres que se originam de células epiteliais são chamados carcinomas e os que se originam de tecidos conjuntivos ou musculares são denominados sarcomas.

2.4.1 CARCINOMA

O tumor de Ehrlich foi introduzido por Paul Ehrlich em 1896 e descrito em 1906. Trata-se de uma neoplasia originária de carcinoma mamário de camundongos fêmeas transplatada inicialmente na forma sólida. Em 1932, Lowenthal e Jahn converteram para forma ascítica, por meio da

passagem seriada de fluido ascítico de animais inoculados intraperitonalmente com células tumorais (DAGLI, 1989).

O Carcinoma de Ehrlich é um dos tumores mais utilizados para experimentação (DAGLI, 1989).

2.4.2 SARCOMA

O sarcoma 180 foi descoberto em 1914 no Godcer Laboratory (Columbia University, NY). Foi encontrado inicialmente como uma massa sólida localizada na região axilar de um camundongo albino (SIGIURA, 1965).

No início foi classificado com carcinoma mamário, mas após vários transplantes subcutâneos, observou-se que suas características morfológicas e seu comportamento eram peculiares de um tumor sarcomatoso, passando então a ser chamado sarcoma 180 (SUGIURA et al., 1994).

As células do sarcoma 180 são de difícil obtenção, sendo utilizada em vários centros de pesquisa e após a inoculação, o tumor desenvolve-se em 90 a 100% dos casos (BUCHI, 2002).

3. Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades farmacológicas da espécie *A. indica* A. Juss

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificação botânica do vegetal;
- Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* A. Juss.
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato - determinação da dose letal para 50% da população (DL₅₀).
- Determinação da concentração letal para 50% da população (CL₅₀).
- Averiguar a atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico da *A. indica* A. Juss
- Avaliar os efeitos antitumorais do extrato da *A. indica* A. Juss através de análise quantitativa em Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180.

4. Artigo I

Artigo submetido à revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

AVALIAÇÃO DA TOXIDADE AGUDA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS *Azadirachta indica* A. Juss.

Maria Rita de Kássia Costa de Farias¹, Ana Ruth Sampaio Grangeiro¹, Clarissa Fernanda Queiroz Siqueira¹, Arquimedes Monteiro Fernandes de Melo¹, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos², Fálba Bernadete Ramos dos Anjos³, Ivone Antônia de Souza^{4*}.

¹Dept. de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco; ² Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco; ³Dept. de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco; ⁴Dept. de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil.

RESUMO

Azadirachta indica A. Juss, pertencente à família Meliaceae, popularmente conhecida como nim e amargosa é uma planta de origem asiática. Diferentes partes da planta apresentam propriedades medicinais como atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica antidiabética antiinflamatória, antiséptica, contra doenças de pele, anti-úlceras e antitumoral. O extrato hidroalcoólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss., família Meliaceae foi avaliado quanto às suas propriedades tóxicas. Inicialmente, avaliou-se a concentração letal 50% (CL₅₀) em larvas de *Artemia salina*, em seguida, determinou-se a dose letal 50%(DL₅₀) em camundongos machos albinos Swiss, administrado por via oral. A CL₅₀ encontrada foi de 617,25537 µg/ml. No estudo da toxicidade aguda foram observadas reações comportamentais estimulantes. Durante os ensaios da toxicidade aguda não houve óbitos dos animais. Dos resultados obtidos pode-se observar que o extrato hidroalcoólico de *Azadirachta indica* A. Juss possui baixa toxicidade quando utilizada por via oral.

Unitermos: *Azadirachta indica*, Meliaceae, Toxidade Aguda, CL₅₀, DL₅₀.

Autor para correspondência: Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, 50670 – 901, Recife – PE / E-mail: ias10@pop.com.br

ABSTRACT

Azadirachta indica belonging family Meliaceae, Known popularly by nim, amargosa is a plant native to Asian. Different part of this plant have been reported to possess medicinal properties like antiviral, antibacterial, antifungal, antidiabetic, anti-inflammatory, antiseptic, curing of skin diseases, antiulcer and antineoplastic. The Hydroalcoholic leaf extract of *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae), was evaluated as to some toxicity features. First, the LC₅₀ (Lethal Concentration 50%) was conducted using *Artemia salina* larvae as bioindicator. The LD₅₀ was performed on male swiss albino mice by oral injections. The study about acute toxicity showed effects stimulating. Administration of leaves extract *A. indica* did not produce died the mice. The mean LC₅₀ related to *A. salina* larvae attained 617,25537 µg/ml. These data suggest that the hydroalcoholic leaf extract of *Azadirachta indica* A. Juss showed low toxicity.

Keywords: *Azadirachta indica*, Meliaceae, acute toxicity, LC₅₀, LD₅₀.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (DAVID; DAVID, 2002, VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005).

No Brasil, considerando a diversidade das espécies vegetais, bem como a riqueza etno-cultural, as plantas medicinais ocupam posição de destaque no tratamento de doenças. Possibilitando deste modo o resgate e a preservação dos saberes populares nas comunidades (AGRA, 1996, GARLET & IRGANG, 2001). Contudo, estas plantas devem ser utilizadas com precaução, pois algumas podem apresentar atividades tóxicas. (LORENZI & MATOS, 2002).

Espécies da família *Meliaceae* são conhecidas na medicina popular por sua atividade inseticida e por sua madeira bastante resistente, fácil de trabalhar, sendo utilizada em vários países na construção civil e na marcenaria (JOLY, 2002, SIMÕES *et al*, 2004).

A espécie *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida popularmente por nim e amargosa, possui atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica (ISMAN *et al.*, 1990; HARIKRISHMAN *et al.*, 2003), antidiabética e antiinflamatória (CHATTOPADHYAY, 1997), antiséptica, contra doenças de pele (MARTINEZ, 2002, WINKALER *et al.*, 2007), anti-úlceras (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2004) e antitumoral (DASGUPTA *et al.*, 2004, KUMAR *et al.*, 2006).

O nim apresenta atividade contra insetos causando repelência e atraso no desenvolvimento (JACKAI *et al.*, 1992; SINGH; SINGH, 1998; SENTHIL *et al.*, 2006, SEGOTTAYAN *et al.*, 2007).

Segundo Thakurta *et al.* (2007), camundongos albinos Swiss tratados com folhas *A. indica* (1800 mg/kg/v.o) não apresentaram efeitos tóxicos e não houve óbito. Também foi observado a ausência de efeito tóxicos em gatos tratados com extrato hidroalcoólico das folhas de nim, na dose de 1000mg/kg/i.p (CHATTOPADHYAY, 1997).

Este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade aguda através da DL_{50} e CL_{50} e as reações comportamentais dos camundongos tratados com o extrato hidroalcoólico (EHA) das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

Folhas de *Azadirachta indica* A. Juss foram coletadas durante o de setembro a dezembro de 2006 na Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA localizado no bairro de San Martin e em seguida foi identificada pela botânica Dra Rita Pereira e registrada em exsicata para depósito no herbário do IPA, sob número 66139. O material vegetal foi acondicionado em sacos

plásticos e levado ao Departamento de Antibióticos, e mantido em local arejado, à temperatura ambiente (27°C), até sua utilização.

Obtenção do extrato

As Folhas coletadas foram conduzidas à estufa numa temperatura de 35° C por um período de 72 horas para secagem. O material seco foi triturado em moinho mecânico e o pó misturado a solução hidroalcoólica (50% de água destilada: 50% de álcool), agitado em temperatura ambiente durante 8 horas repetindo-se o procedimento por três vezes. Em seguida o material filtrado foi concentrado em rotaevaporador sob pressão. O extrato concentrado apresentou característica viscosa em temperatura ambiente. Para realização da experimentação o material foi dissolvido em solução fisiológica.

Animais

Foram utilizados camundongos machos albinos Swiss (*Mus musculus*), com aproximadamente 60 dias de nascidos e peso entre 25 e 35g, procedentes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram divididos em grupos (n=5) e mantidos em gaiolas de polipropileno com água e ração *ad libitum*, em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura (22 ± 2°C). O protocolo experimental foi realizado de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pernambuco sob o número 23076.006048/2008-17.

Determinação da DL₅₀

Para realização do ensaio os animais permaneceram em jejum durante oito horas e receberam água *ad libitum*. Os animais foram divididos em grupos: controle e tratado. Ao grupo controle foi administrado por via oral (v.o), solução fisiológica (0,9%) enquanto os grupos tratados receberam

doses crescentes do extrato hidroalcoólico (EHA) das folhas de *A. indica* A. Juss (400, 800, 1600, 1920, 3000, e 5000 mg/kg/v.o). Após a administração os animais foram observados durante 60 minutos, nos quais foram analisadas as posturas, mobilidade e agressividade de acordo com a tabela de Malone (1977). Todos os efeitos foram comparados com o grupo controle e os animais foram monitorados por mais 72 horas.

Determinação da CL₅₀

A CL₅₀ é utilizada para determinar a toxicidade sobre *Artemia salina*, sendo um método rápido, confiável, simples e de baixo custo (SIQUEIRA; DANTAS, 2000).

Para a determinação da CL₅₀ foram utilizadas larvas de *Artemia salina* Leach obtidas da incubação de cerca de 20mg de cisto de *A. salina*, sob luz artificial durante 48 horas. As larvas foram divididas em grupos e ficaram expostas a diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Azadirachta indica* A. Juss e os percentuais de mortalidade foram determinados 24 horas após o experimento (MEYER *et al.*, 1982).

RESULTADOS

Toxicidade aguda e determinação da DL₅₀

O extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* apresentou um rendimento de 10,5%. Durante a avaliação dos efeitos da toxicidade aguda foi constatado que as doses produziram várias reações nos primeiros 60 minutos de observação como demonstrados na tabela 1. Os efeitos mais observados foram reações comportamentais com características estimulantes, tais como piloereção, exoftalmia, reação de fuga, movimento estereotipado, ereção de cauda, movimento de vibrissas, postura de ataque e tremores finos.

Entretanto, os animais também apresentaram comportamentos depressores, tais como diminuição da frequência respiratória e abaixamento do trem posterior. As doses agiram diferentemente em relação ao tempo, manifestação, frequência e intensidade do efeito.

Nas doses de 400, 800, 1600 e 1920mg/kg/v.o foram observados nos animais, sinais de hipertrofia testicular e aumento da libido, fato que não foi observado nas doses mais elevadas. Nas doses de 3000 e 5000mg/kg/v. o os animais ficaram bastante agitados e agressivos.

Em todas as concentrações administradas, 400, 800, 1600, 1920, 3000 e 5000 mg/kg/v.o, não houve óbito de nenhum animal durante os 60 minutos de observação e 72hs após administração.

Determinação da CL₅₀

O teste foi realizado em triplicata para cada concentração. As concentrações utilizadas no teste foram: 1000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL obtidas a partir de diluições da solução inicial em água do mar.

O cálculo da concentração letal média (CL₅₀) do extrato foi realizado a partir das concentrações estudadas utilizando o programa PROBIT. exe. A taxa de mortalidade do EHA cresceu progressivamente com o aumento da dose (gráfico 1) e a CL₅₀ do EHA de *A. indica* foi de 617,25537 µg/ml.

DISCUSSÃO

As plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus componentes, seja pela presença de contaminantes, ou até mesmo, resultado das preparações caseiras duvidosas e também os adulterantes contidos em fitoterápicos comercializados (TUROLLO; NASCIMENTO, 2006). Portanto, todo produto natural usado para fins terapêuticos

deveria ser submetido a testes de eficiência e segurança com as drogas sintéticas (TALALAY; TALALAY, 2001).

Os resultados obtidos sugerem que o extrato hidroalcoólico de *A. indica* atua sobre os neurotransmissores excitatórios e inibitórios. Os efeitos estimulantes observados provavelmente devem-se à liberação dos neurotransmissores excitatórios ou a inibição da recaptação. A inibição de recaptação aumenta a concentração de neurotransmissores com os receptores, o que leva ao aumento da atividade do neurônio. (SILVA, 2002). Os efeitos depressores foram pouco evidentes, provavelmente porque houve um esgotamento dos neurotransmissores excitatórios. (SILVA, 2002).

A *A.indica* é constituída quimicamente por liminóides que são tetraterpenóides e possui atividade inseticida (SIMÕES *et al.*, 2004, SENTHIL *et al.*, 2006). Os terpenos são conhecidos por apresentar ação no sistema cardiovascular e no sistema nervoso central (SIMÕES *et al.*, 2004). Aumento da frequência respiratória, piloereção, agitação, reação de fuga foram efeitos observados com doses mais elevadas do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica*, possivelmente pela presença de terpenos.

CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos da experimentação sugere-se que o extrato hidroalcoólico de *Azadirachta indica* A. Juss com dose máxima de 5000 mg/kg/v.o apresentou efeitos que caracterizaram sua ação como estimulante a nível central nos animais.

Segundo os dados obtidos na DL_{50} , o extrato hidroalcoólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss pode ser considerado atóxico quando administrado por via oral (SCHUARTSMAN, 1992).

Em relação a CL_{50} , o extrato pode ser considerado moderadamente tóxico já que são classificadas como tóxicas, substâncias, com CL_{50} próximos a zero $\mu\text{g/mL}$ e valores próximos de 1000 são menos tóxicas (MEYER *et al.*, 1982).

Há perspectivas para que novos estudos sejam realizados, corroborando na elucidação dos mecanismos de ação deste vegetal, bem como prevenir a população que apesar de ser considerada atóxica a *A. indica* quando administrada por via oral causa efeitos como aumento da frequência respiratória e agitação.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, pelo auxílio na obtenção do material botânico. Aos graduandos Isla Vanessa Bastos e a Mestranda em Ciências Farmacêuticas Ana Ruth Sampaio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRA, M.F. *Plantas da medicina popular dos cariris velhos - Paraíba – Brasil: espécies mais comuns*. João Pessoa: União, 1996. 125 p.
2. BANDOYOPADHYAY, U, KAUSHIK, B, SENGUPTA, A, MOITRA, P, DUTTA, P, SARKAR, D, DEBNATH, P, GANGULUY, C.K, RANAJIT, B.K. 2004. Clinical studies on the effect of Neem (*Azadirachta indica*) bark extract on gastric secretion and gastroduodenal ulcer. *Life Sciences* 75, 2867 – 2878.
3. CHATTOPADHYAY, R.R, 1997. Effect of *Azadirachta indica* hidroalcoholic leaf extract on the cardiovascular system. *Gen. Pharmac.* Vol. 28, 3, 449 -451, 1997.
4. DAVID, J.P.L, DAVID, J.M, 2002. *Plantas Medicinais. Fármacos derivados de plantas*. In: SILVA, P, 2002. *Farmacologia*. 6º ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. P 135 – 145.
5. DASGUPTA, T, BANERJEE, T, YADAVA, P.K, R.A.O, A..R. 2004. Chemoprotetive potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 23 – 36.
6. VEIGA JÚNIOR V.F, PINTO A.C. 2005. Plantas Medicinais: Cura segura? *Química Nova* 28 (3), 519 – 528.
7. PANIZZA, S. *Plantas que curam (cheiro de mato)*. 26ª ed., São Paulo: IBRASA – Instituição Brasileira de Difusão Cultural, p. 31-32, 2002.
8. GARLET, T.M.B, IRGANG, B.E. 2001. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de fevereiro de 1999 a julho de 1999. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 4 (1), p. 9-18.

9. HARIKRISHMAN, R, RANI, M.N, BALASUNDARAM, C, 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp. *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221, 41 – 50.
10. ISMAN, M.B, KOUL, O, LUCZYSKI A, KAMINSKI, J, 1990. Inseticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *J. Agric. Food. Chem.* 38, 1406 – 1411.
11. JACKAI, L.E.N, INANG, E.E, NWOBI, P, 1992. The potencial for controlling post-flowering pests of cowpea, *Vigna unguiculata* Walp. Using neem, *Azadirachta indica* A Juss. *Trop. Pest Manag. Sci.* 38, 56 -60.
12. JOLY, BA. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Editora Nacional, 2002, 777p.
13. KUMAR, S, SURESH, P.K, VIJAYABABU, M.R, ARUNKUMAR, A, ARUNAKARAN, J. 2006. Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC - 3). *Journal of Ethnopharmacology* 105, 246 – 250
14. LORENZI, H, MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, 512 p.
15. MALONE, M.H., 1977. *Natural products drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*.
16. MARTINEZ, SSO, Nim – *Azadirachta indica* – natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 142p, 2002.
17. MEYER B.N, FERRIGNI N.R, PUTNAM J.E, JACOBSEN L.B, NICHOLS D.E, MCLAUGHLIN J.L 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 45: 31-34.

18. SCHVARTSMAN, S. *Produtos químicos de uso domiciliar – segurança e riscos toxicológicos*. São Paulo: Almed, 1992, 92p.
19. SEGOTTAYAN, S.N, MAN Y.C, CHAE, H.P, HONG, Y.S, JAE, D.K, SEOK M.K. 2007. The toxic effects of neem extract and azadirachtin on the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal) (BPH) (Homoptera: Delphacidae). *Chemosphere*. 67, 80 – 88.
20. SENTHIL, N.S, KALAIVANI, C.K., MURUGAN, K. 2006. The toxicity and behavioural effects of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) the rice leafhopper. *Chemosphere* 62, 1381-1387
21. SIMÕES, C.M.O, SCHENKEL, E.P, GOSMANN, G, MELLO, J.C.P, MENTZ, L.A, PETROVICK, P.R.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004, 1096p.
22. SINGH, S, SINGH, R.P. 1998. Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts and azadirachtin as oviposition deterrents against the melon fly (*Bactrocera cucurbitae*) and the oriental fruit fly. *Phytoparasitica*. 26, 6 – 12.
23. SIQUEIRA, J.M, BOMM, M.D *et al.* 1998. Estudo Fitoquímico de *Unonopsis lingmanii* Annonaceae, biomonitoramento pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Química nova* 24 (2), 185-187.
24. THAKURTA, P , BHOWMIK ,P , MUKHERJEE, S , HAJRA, T.K , PATRA, A, BAG, P.K. 2007. Antibacterial, antisecretory and antihemorrhagic activity of *Azadirachta indica* used to treat cholera and diarrhea in India. *Journal of Ethnopharmacology* 111(3), 607 – 612.
25. TALALAY, P & TALALAY, P. 2001. The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. *Academic Medicine* 76, 238 – 247.

26. TUROLLO, M.S.R, NASCIMENTO, E.S. 2006. Informações Toxicológicas de Alguns Fitoterápicos Utilizados no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol 42(2), abr/jun.
27. WINKALER, E.U *et al*. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish of *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007.

Tabela 1 - Efeitos toxicológicos provocados pelas doses do extrato hidroalcoólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss administradas em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*).

Dados obtidos durante os 60 minutos após administração do extrato.

PARÂMETROS	DOSE (mg/kg)					
	400	800	1600	1920	3000	5000
ESTIMULANTES						
Aum freq resp.	+	+	+	++	++	++
Piloereção	+	+	++	++	+++	+++
Exoftalmia	+	+	++	++	+++	+++
Mov estriotipado	+	+	++	++	+++	+++
Tremores finos	+	+	+	+	++	++
Ereção de cauda	+	+	+	++	+++	+++
Mov. Circular	+	+	+	+	+	++
Mov. Vibrissias	+	+	+	++	+++	+++
Agitação	+	+	+	++	+++	+++
Fascilações na cauda	-	-	-	-	-	-
Convulsão tônico	-	-	-	-	-	-
Postura ataque	+	+	+	+	++	+++
Saltos	+	+	++	+++	+++	+++
Lev. Trem posterior	-	-	-	-	-	-
DEPRESSORES						
Dim. Freq. Resp.	-	-	-	+	+	+
Dispnéia	-	-	-	-	-	-
Prostação	-	-	-	-	-	-
Alteração marcha	-	-	-	-	-	-
Abaix trem posterior	+	+	+	+	+	+
OUTROS						
Espasmos	-	-	-	-	-	-
Excreção fecal	+	+	+	+	++	++
Diarréia	-	-	-	-	-	-
Diurese	+	+	+	+	+	+
Contorção abdominal	-	-	-	+	+	+
Distensão abdominal	-	-	+	+	++	++
Refluxo	+	+	+	+	++	++
Comportamento exploratório	+	+	+	+	+	++
Reação de fuga	++	++	++	++	+++	+++
Agressividade	+	+	++	++	+++	+++
Cianose	-	-	-	-	-	-
Edema de focinho	+	+	++	++	++	++
Hipertrofia testicular	++	+++	+++	+++	+	+
Petéquias	-	-	-	-	+	+
Alt: depressão X agitação	+	+	-	-	-	-
ÓBITOS	0	0	0	0	0	0

- = sem efeito + = efeito leve ++ = efeito moderado +++ = efeito acentuada

* Adaptada de Malone, 1977.

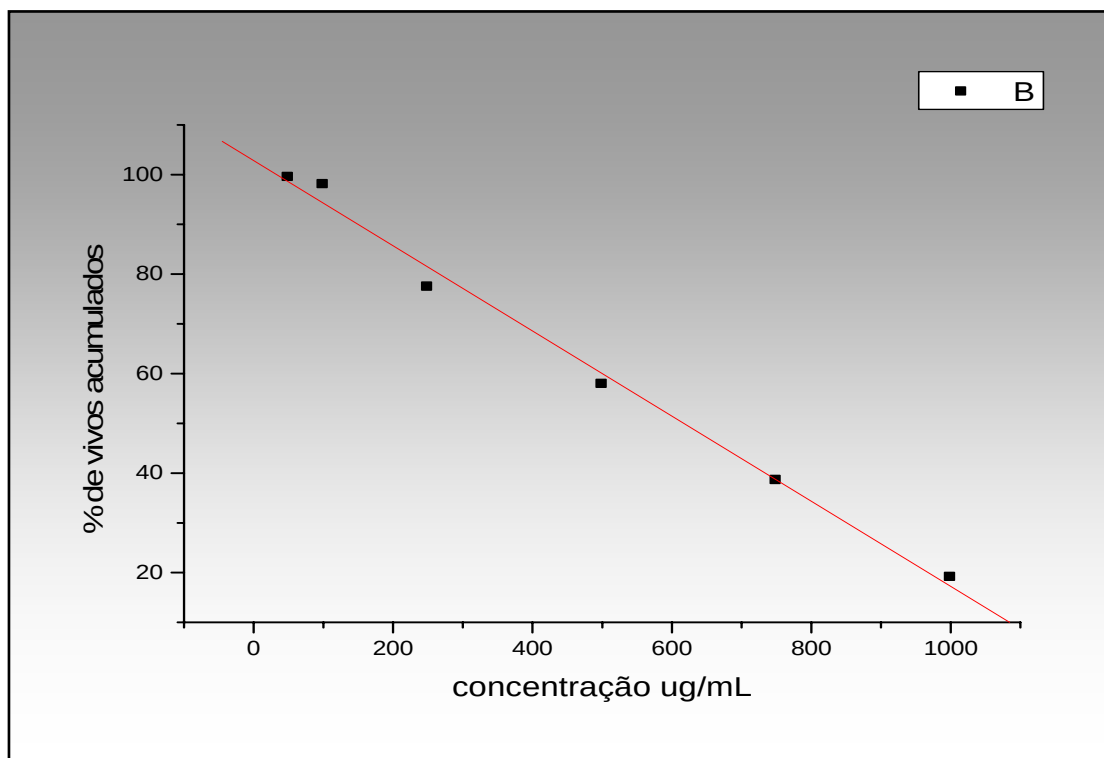


GRÁFICO 1: Porcentagem de vivos acumulados X concentração do extrato hidroalcoólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss em *Artemia salina* L.

5. Artigo II

Artigo a ser submetido à revista Brasileira de Farmacognosia

ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS *Azadirachta indica* A. Juss . EM *Rattus norvegicus*

Maria Rita de Kássia Costa de Farias¹, Ana Ruth Sampaio Grangeiro¹, Aldo César Passilongo¹, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos², Fálba Bernadete Ramos dos Anjos³, Ivone Antônia de Souza^{4*}.

¹Dept. de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco; ² Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco; ³Dept. de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco; ⁴Dept. de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil.

RESUMO

A espécie *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida popularmente por nim e amargosa, possui atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica, antidiabética, antiinflamatória, antiséptica, contra doenças de pele, anti-úlceras e antitumoral. Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de triterpenos, saponinas, alcalóides, taninos, cumarinas, proteínas, flavonóides e açúcares. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação do extrato hidroalcoólico (EHA) das folhas de *A. indica* na reversão da fase aguda do processo inflamatório do edema de pata induzido por carragenina. O grupo padrão recebeu indometacina (20mg/kg), ao controle foi administrado solução fisiológica 0,9% e o grupo tratado recebeu doses de 250, 500 e 1000mg/kg do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica*, todos por via oral (v.o). A avaliação do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* revelou um aumento significativo do volume do edema, sugerindo um efeito edematogênico em todas as doses administradas (250, 500 e 1000mg/kg/v.o).

Unitermos: *Azadirachta indica* A. Juss, Edema de pata, efeito edematogênico.

ABSTRACT

Azadirachta indica belonging family Meliaceae, Known popularly by nim, amargosa is a plant native to Asian. Different part of this plant have been reported to possess medicinal properties like antiviral, antibacterial, antifungal, antidiabetic, anti-inflammatory, antiseptic, curing of skin diseases, antiulcer and antineoplastic. The compounds isolated from *A. indica* have been demonstrated saponins, triterpenes, tannins, alkaloids, flavonoids, coumarin, proteins and sugars. The group standard received indomethacin (20mg/kg), group control was administered solution physiological 0,9% and the group test received doses at 250, 500 and 1000mg/kg of hydroalcoholic extract leaves of *A. indica*, route oral (v.o). This work have with objective evaluate the activity of anti-inflammatory hydroalcoholic leaves extract *A. indica* carragenan-induced hind paw edema model was used in wistar rats (*Rattus norvegicus*). The found results presented indicative that extract of leaves of *A. indica* increased significant of the volume of edema, thus suggesting a possible edematogenic effects, in doses administered (250, 500 and 1000mg/kg/v.o).

Keywords: *Azadirachta indica* A. Juss, hind paw edema, edematogenic effect.

INTRODUÇÃO

A família Meliaceae compreende 50 gêneros que estão distribuídos predominantemente nos trópicos de todo mundo (SCHULTZ, 1984, JOLY, 2002). O gênero *Azadirachta* possui uma única espécie, *Azadirachta indica* A. Juss que é popularmente conhecida como nim e amargosa. O nim é uma planta de origem asiática, de porte arbóreo, as folhas são alternas e suas flores são hermafroditas reunidas em inflorescência (JOLY, 2002, SODEPAZ, 2006).

Estudo já realizados demonstraram que a espécie *A. indica* A. Juss possui atividade antiviral, antibacteriana e antifúngica (ISMAN *et al.*, 1990; HARIKRISHMAN *et al.*, 2003), antidiabética e antiinflamatória (CHATTOPADHYAY, 1997), antiséptica, contra doenças de pele (MARTINEZ, 2002, WINKALER *et al.*, 2007, anti-úlceras (BANDYOPADHYAY *et al.*, 2004) e antitumoral (DASGUPTA *et al.*, 2004, KUMAR *et al.*, 2006).

Segundo Martinez (2002) & Senthil *et al* (2006), *A. indica* é conhecida há 5.000 anos e apresenta ação contra mais de 430 espécies de pragas que ocorrem em diversos países, causando múltiplos efeitos, tais como: repelência, interrupção do desenvolvimento e da ecdise, atraso no desenvolvimento, redução na fertilidade e fecundidade, e várias outras alterações no comportamento e na fisiologia dos insetos que podem levá-los a morte.

De acordo com Ross (2003), a *A. indica* contém alcalóides, taninos, cumarinas, proteínas, flavonóides, saponinas e açúcares. Estudos fitoquímicos vêm demonstrando a presença de fenóis, triterpenos e saponinas no extrato da casca de nim. (SUBRAMANIAN; LAKSHMANAN, 1996).

Visto a importância etnofarmacológica da *A. indica*, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação do extrato hidroalcoólico (EHA) das folhas de *A. indica* na reversão da fase aguda do processo inflamatório do edema de pata induzido por carragenina.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

Folhas de *Azadirachta indica* A. Juss foram coletadas durante o período de setembro a dezembro de 2006 na Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA localizado no bairro de San Martin e em seguida foi identificada pela botânica Dr^a Rita Pereira e registrada em exsicata para depósito no herbário do IPA, sob número 66139. O material vegetal foi acondicionado em sacos plásticos e levado ao Departamento de Antibióticos, e mantido em local arejado, à temperatura ambiente (27⁰C), até sua utilização.

Obtenção do extrato

As Folhas coletadas foram conduzidas à estufa numa temperatura de 35° C por um período de 72 horas para secagem. O material seco foi triturado em moinho mecânico e o pó misturado a

solução hidroalcoólica (50% de água destilada: 50% de álcool), agitado em temperatura ambiente durante 8 horas repetindo-se o procedimento por três vezes. Em seguida o material filtrado foi concentrado em rotaevaporador sob pressão. O extrato concentrado apresentou característica viscosa em temperatura ambiente. Para realização da experimentação o material foi dissolvido em solução fisiológica.

Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas (*Rattus norvegicus*), com aproximadamente três meses, pesando entre 180g e 250g procedentes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram divididos em grupos (n=5) e mantidos em gaiolas de polipropileno com água *ad libitum* e jejum por 12 horas antes do ensaio. Foram controladas as condições de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$). O protocolo experimental foi de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pernambuco sob o número 23076.006048/2008-17.

Edema de pata induzido por carragenina

A avaliação da atividade antiinflamatória foi realizada segundo o método de Winter et al., (1962), no qual o edema foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina a 1% na região subplantar da pata esquerda posterior dos animais (controle, padrão e tratados). Trinta minutos antes da injeção de carragenina os animais do grupo tratado receberam doses do extrato hidroalcoólico de *A. indica* A. Juss (250mg/kg, 500mg/kg e 1000mg/kg), o grupo padrão recebeu indometacina (20 mg/kg) e o grupo controle, solução salina a 0,9%, todos por via oral. Em seguida, a cada 60 minutos foram quantificados os volumes das patas com edema, fazendo um total de 6 horas de observação.

O volume da pata foi calculado segundo a fórmula:

Vf - Vi.

Onde:

Vf - volume final da pata a cada tempo

Vi - volume inicial

Análise Estatística

Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e testados com análise de variância (ANOVA) e teste “t” de student, para avaliar as diferenças entre o grupo controle e tratados. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados obtidos no teste de atividade antiinflamatória das folhas de *A. indica* estão representados no Gráfico 1. A administração do extrato hidroalcoólico de *A. indica* nas doses de 250, 500 e 1000mg/kg/v.o provocaram um aumento do volume do edema. A atividade flogística já havia sido observada durante o teste de toxicidade aguda em camundongos, onde foi visualizado edema de focinho nos animais tratados com extrato.

O pico máximo do volume do edema nos grupos tratados com doses de 250 e 1000mg/kg do extrato e com indometacina (20mg/kg) foi evidenciado na terceira hora (Figura 1).

Na terceira e sexta hora houve um aumento significativo do edema no grupo tratado com extrato na dose de 250mg/kg (35,1% e 36% respectivamente). Na quinta hora, os animais tratados com extrato nas doses de 500 e 1000mg/kg apresentaram aumento significativo do edema, com índices de 27,7 % e 35,5% respectivamente.

A indometacina reduziu significativamente o volume do edema dos animais do grupo padrão nas quarta, quinta e sexta hora com percentual inibitório de 46,1%, 35,3% e 26% respectivamente, quando comparado com o grupo controle

DISCUSSÃO

Dados da organização mundial de Saúde (OMS) demonstram que cerca de 80% da população mundial já fez uso de alguma planta considerada medicinal a fim de aliviar algum de seus males (CARVALHO & ALMANÇA, 2003, FITOTERÁPICO, 2005).

Nesse contexto, estudos sobre a medicina tradicional vêm ganhando destaque nas áreas dos agentes antiinflamatórios, anticancerígenos, antimicrobianos, antivirais usados nas doenças infecciosas (SILVA, 2002).

A dor crônica afeta milhões de pessoas todo o ano, implica ao longo do tempo problemas sociais e comportamentais, diminuindo a qualidade de vida e afastando o indivíduo do trabalho (SILVA, 2002). A lesão tissular provoca a liberação de uma série de neuromediadores que promovem e facilitam a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas como edema, calor e vermelhidão (GOODMAN; GILMAM, 2003).

O teste do edema de pata induzido por carragenina 1% é bastante utilizado como modelo experimental de inflamação, assim como avaliação de substâncias antiinflamatórias (LUCENA *et al*, 2006).

Segundo Chattopadhyay (1997), o extrato etanólico das folhas de *A. indica* apresentou atividade antiinflamatória quando testado em ratos nas doses de 500, 1000 e 2000mg/kg/i.p. as diferenças entre os resultados obtido e a literatura deve-se provavelmente a via de administração utilizada (oral X intrapeitonial) e ao tipo de solvente (hidroalcoólico X etanólico). No extrato hidroalcoólico ocorre maior extração de saponinas que são substâncias polares e conhecidas por sua

ação hemolítica (SIMÕES *et al.*, 2004). Tal fato sugere que a atividade edematogênica do EHA das folhas de *A. indica* deve - se ao grande número de saponinas.

A avaliação do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* revelou um aumento significativo do volume do edema nas doses de 250 (terceira e sexta hora), 500 e 1000mg/kg (quinta hora), sugerindo que o EHA das folhas de *A. indica* atua na liberação de neuromediadores como histamina e/ou bradicinina e/ou prostaglandinas. Outro possível mecanismo do efeito edematogênico é a liberação de neuromediadores excitatórios como aspartato e glutamato e/ou produção de óxido nítrico (SILVA, 2002, GOODMAN; GILMAN, 2003).

Os efeitos observados nos animais tratados com indometacina estão de acordo com Sanchez-Mateo (2006) que afirmou tratar-se de um potente inibidor da ciclooxigenase-2, capaz de reduzir o edema e aliviar a dor.

CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss administrado por via oral em *Rattus norvegicus* apresentou significativamente efeito edematogênico nas doses de 250 (terceira e sexta hora), 500 e 1000mg/kg (quinta hora), sugerindo um aumento da liberação de fatores inflamatórios.

Outros protocolos experimentais de atividade antiinflamatória devem ser realizados, afim de complementar os resultados obtidos e prevenir a população que utiliza este vegetal como inseticida biológico e na indústria de cosmético, que a manipulação de *A. indica* pode causar reações inflamatórias, ou mesmo lesões cutâneas a partir da formação edema. Este vegetal também pode desencadear reações de hipersensibilidade àqueles que têm mais predisposição a alergias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BANDOYOPADHYAY, U, KAUSHIK, B, SENGUPTA, A, MOITRA, P, DUTTA, P, SARKAR, D, DEBNATH, P, GANGULUY, CK, RANAJIT, BK. 2004. Clinical studies on the effect of Neem (*Azadirachta indica*) bark extract on gastric secretion and gastroduodenal ulcer. *Life Sciences* 75, 2867 – 2878.
2. CARVALHO, J.T.C., ALMANÇA, C.C.J., *Formulário de Prescrição Fitoterápica*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 166p.
3. CÔRREA, M. PIO. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Vol III, 1984.
4. CHATTOPADHYAY, R.R., 1997. Effect of *Azadirachta indica* hidroalcoholic leaf extract on the cardiovascular system. *Gen. Pharmac.* Vol. 28, 3, 449 -451, 1997.
5. DASGUPTA, T, BANERJEE, T, YADAVA, P.K, RAO, A.R. 2004. Chemoprotective potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 23 – 36.
6. FITOTERAPICO. Disponível em < <http://www.herbario.com.br/bot/plantmed/fitoter.htm> > acessado em 07 de setembro de 2005.
7. GOODMAN & GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10º ed. Rio de Janeiro: McGraw- Hill, 2003. 1646p.
8. HARIKRISHMAN, R., RANI, M. N., BALASUNDARAM, C., 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp. *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221, 41 – 50.
9. ISMAN, M. B., KOUL, O., LUCZYSKI A., KAMINSKI, J., 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *J. Agric. Food. Chem.* 38, 1406 – 1411.

10. JOLY, B. A. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Editora Nacional, 2002, 777p.
11. KUMAR, S, SURESH, P.K, VIJAYABABU, M.R, ARUNKUMAR, A, ARUNAKARAN, J. 2006. Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC -3). *Journal of Ethnopharmacology* 105, 246 – 250.
12. LUCENA J.E.X, BISPO M.D, NUNES R.S, CAVALCANTI S.C.H, TEIXEIRA-SILVA F, MARÇAL R.M, ANTONIOLLI A.R. 2006. Efeito Antinociceptivo e Antiinflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schum (Rubiaceae). *Rev. Bras Farmacognosia* 16 (1), 67 – 72.
13. MARTINEZ, S. S. O Nim – *Azadirachta indica* – natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 142p, 2002.
14. SANCHEZ-MATEO, C.C, BONKANKA, C.X, HERNÁNDEZ-PÉREZ, M, RABANAL, R.M. 2006. Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 107, p 1-6.
15. SCHULTZ, A. R. H. *Introdução à botânica sistemática*. V. II, Porto Alegre: Editora da Universidade. 4^a ed. p. 414. 1984.
16. SENTHIL NATHAN, S., KALAIVANI., CHUNG, K., MURUGAN, K., 2006. The toxicity and behavioural effects of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) the rice leafhopper. *Chemosphere* v 62, 1381-1387
17. SILVA, P. *Farmacologia*. 6^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1374p.
18. SODEPAZ – SOLIDARIDAD PARA EL DESARROLLO Y LA PAZ. Disponível em < <http://www.sodepaz.org/nim/> > acessado em 17 de fevereiro de 2006.
19. SUBRAMANIAN, M. A., LAKSHMANAN, K. K., 1996. *Azadirachta indica* A. Juss. Stem bark as an anti-leprosy source. In: Singh, R. P., Chari, M. S., Raheja, A. K., Kraus, W (Eds.),

Neem and Environment, vol. 2. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New delhi, pp.1143-1150.

20. ROSS, I. A. *Medicinal plants of the world chemical constituents traditional and modern uses*. New Jersey: Humana Press; 2003. p.315-328.
21. WINKALER, E. U. et al. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish of *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007.
22. WINTER, C.A, RISLEY, E. A, NUSS, G. W . 1962. Carrageenan – induced of edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 111, p 544-547.

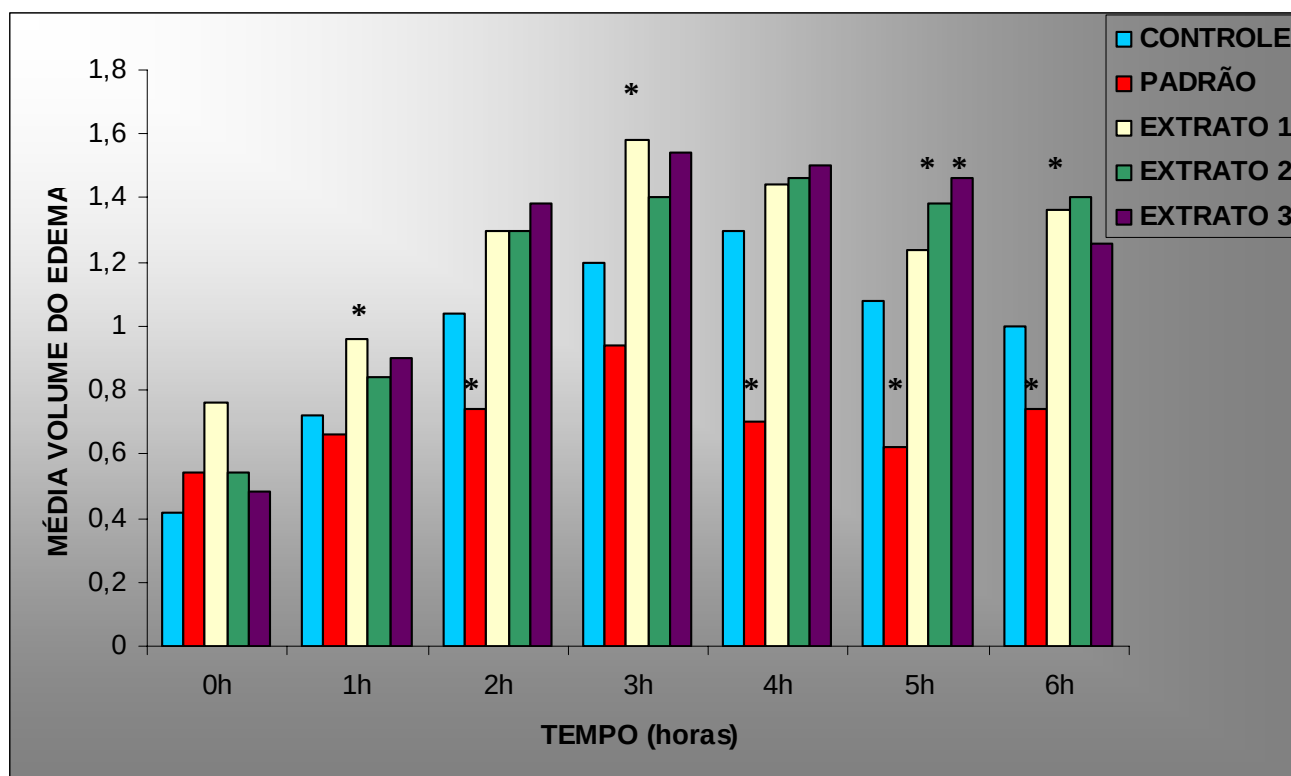


GRÁFICO 1. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* nas doses de 250 (extrato 1), 500 (extrato 2) e 1000mg/kg (extrato 3), administrados por via oral, no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ comparados os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina 0,09%. Teste “*t*” de student ($n=5$).

6. Artigo III

Artigo a ser submetido à revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas

EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* A. Juss. FRENTE AO CARCINOMA DE EHRLICH E SARCOMA 180 EM CAMUNDONGOS ALBINOS (*Mus musculus*).

Maria Rita de Kássia Costa de Farias¹, Ana Ruth Sampaio Grangeiro¹, Aldo César Passilongo¹, Sérgio Nóbrega¹, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos², Fálba Bernadete Ramos dos Anjos³, Ivone Antônia de Souza^{4*}.

¹Dept. de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco; ² Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco; ³Dept. de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco; ⁴Dept. de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE, Brasil.

RESUMO

O câncer é uma doença devastadora que afeta a humanidade. A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que o número estimado de novos casos de câncer em todo o mundo chegará a um bilhão no século XXI. *Azadirachta indica* A. Juss, pertencente à família Meliaceae, popularmente conhecida como nim e amargosa é uma planta de origem asiática. Diferentes partes da planta apresentam propriedades medicinais como anti-séptica, na cura da diabetes, problemas dermatológicos, inseticida biológico. Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de triterpenos, saponinas, alcalóides, taninos, cumarinas, proteínas, flavonóides e açúcares. Este trabalho investigou a atividade antitumoral do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* frente ao Carcinoma de Ehrlich e ao Sarcoma 180 implantados em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*). De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss nas doses de 250, 500 e 1000mg/kg não apresentaram redução significativa dos tumores Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180.

Unitermos: *Azadirachta indica*, Atividade antitumoral, Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180.

ABSTRACT

Câncer is a second disease that causes mortality in human. The World Health Organization (WHO) has estimated that new cases of cancer can to reach one billion in 21st century. *Azadirachta indica* belonging family Meliaceae, Known popularly by nim, amargosa is a plant native to Asian. Different part of this plant have been reported to possess medicinal properties like antiseptic, antidiabetic, wound-healing, curing of skin diseases and pest-control agent. The compounds isolated from *A. indica* have been demonstrated saponinas, triterpenes, tannins, alkaloids, flavonoids, coumarin, proteins and sugars. This work have with objective evaluate the antineoplastic activity of hidroalcoholic leaves extract *A. indica* front Ehrlich's Carcinoma and Sarcoma 180 in mice (*Mus musculus*). The found results presented indicative that extract of leaves of *A. indica* with doses of 250, 500 and 1000mg/kg didn't produce tumoral inhibition significant in Ehrlich's Carcinoma and Sarcoma 180.

Keywords: *Azadirachta indica*, activity antineoplastic, Ehrlich's Carcinoma and Sarcoma 180.

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença devastadora que afeta a humanidade. A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que o número estimado de novos casos de câncer em todo o mundo chegará a um bilhão no século XXI. O câncer pode ser controlado e, se diagnosticado precocemente, a cura é possível em muitos casos (CÂNCER, 2008). Novos agentes quimiopreventivos e quimioterapêuticos estão sendo desenvolvidos para a prevenção e tratamento contra o câncer. Na busca de novos medicamentos, que tenham atividade antitumoral e pouco efeito colateral, as plantas medicinais tem sido de fundamental importância na terapia contra o câncer, pois parte dos agentes antitumorais utilizados na prática clínica são oriundos de produtos naturais ou de seus derivados (MURRAY *et al.*, 2005).

Azadirachta indica A. Juss, pertencente à família Meliaceae, popularmente conhecida como nim e amargosa é uma planta de origem asiática, de porte arbóreo, as folhas são alternas e suas flores são hermafroditas reunidas em inflorescência (JOLY, 2002, SODEPAZ, 2006).

Em vários países, incluindo o Brasil, essa árvore tem sido estudada para fornecer produtos alternativos aos agrotóxicos, como extratos de frutos, sementes, ramos e folhas, e para controlar pragas em culturas onde o uso de agrotóxico não é permitido, como no caso dos cultivos orgânicos (AZADIRACHTA INDICA, 2004). Além disso, algumas pesquisas vêm mostrando que o nim é uma planta medicinal que pode ser usada como anti-séptico, tônico, vermífugo, na cura da diabetes, malária, problemas dermatológicos, combate a sarna, pulga. (CHATTOPADHYAY, 1997; MARTINEZ, 2002; WINKALER *et al*, 2007).

Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de fenóis, triterpenos e saponinas no extrato da casca de *A. indica* (SUBRAMANIAN; LAKSHMANAN, 1996), além da presença de alcalóides, taninos, cumarinas, proteínas, flavonóides, saponinas e açúcares (ROSS, 2003).

Este trabalho investigou a atividade antitumoral do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* frente ao Carcinoma de Ehrlich e ao Sarcoma 180 implantados em camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*).

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

Folhas de *Azadirachta indica* A. Juss foram coletadas durante o período de setembro a dezembro de 2006 na Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA localizado no bairro de San Martin e em seguida foi identificada pela botânica Dr^a Rita Pereira e registrada em exsicata para depósito no herbário do IPA, sob número 66139. O material vegetal foi acondicionado em

sacos plásticos e levado ao Departamento de Antibióticos, e mantido em local arejado, à temperatura ambiente (27°C), até sua utilização.

Obtenção do extrato

As Folhas coletadas foram conduzidas à estufa numa temperatura de 35° C por um período de 72 horas para secagem. O material seco foi triturado em moinho mecânico e o pó misturado a solução hidroalcoólica (50% de água destilada: 50% de álcool), agitado em temperatura ambiente durante 8 horas repetindo-se o procedimento por três vezes. Em seguida o material filtrado foi concentrado em rotaevaporador sob pressão. O extrato concentrado apresentou característica viscosa em temperatura ambiente. Para realização da experimentação o material foi dissolvido em solução fisiológica.

Animais

Foram utilizados camundongos machos albinos Swiss (*Mus musculus*), com aproximadamente 60 dias de nascidos e peso entre 25 e 35g, procedentes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram divididos em grupos (n=5) e mantidos em gaiolas de polipropileno com água e ração *ad libitum*, em condições controladas de iluminação (ciclo 12 horas claro/escuro) e temperatura (22 ± 2°C). O protocolo experimental foi de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética de Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pernambuco sob o número 23076.006048/2008-17.

Implantação dos Tumores

Para o transplante dos tumores (Sarcoma 180 e Carcinoma de Ehrlich), foi retirada a massa tumoral de um animal doador. A massa foi fragmentada, eliminando partes do tecido que estavam necrosadas e as regiões do tumor que apresentaram uma alta concentração de células em

crescimento foram separadas e colocadas em solução fisiológica associado ao antibiótico. Um fragmento desta amostra com cerca de 3mm de diâmetro foi introduzido subcutaneamente na região axilar do animal receptor (STOCK *et al.*, 1955, KOMIYAMA *et al.*., 1992).

Tratamento (Inibição do Tumor)

Os animais transplantados foram divididos em três grupos: controle, padrão e teste. O grupo controle recebeu solução fisiológica, o padrão, metotrexato (5 mg/kg/v.o) e ao grupo teste foi administrado o extrato de *A. indica* A. Juss nas doses de 250mg/kg/v.o, 500mg/kg/v.o e 1000mg/kg/v.o por via oral, durante sete dias. O tratamento foi iniciado 48 horas após o transplante dos tumores. Ao final do tratamento todos os animais foram sacrificados, e os tumores retirados, dissecados e pesados.

A inibição tumoral foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$TWI\% = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Onde:

TWI% = % de inibição tumoral; C = média dos pesos dos tumores dos animais do grupo controle; T = média dos pesos dos tumores dos animais do grupo teste

Análise Estatística

Os valores foram expressos em média $\pm$ desvio padrão e testados com análise de variância (ANOVA) e teste “t” de student, para avaliar as diferenças entre o grupo controle e tratados. O nível de significância foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os resultados obtidos dos animais dos grupos controle, padrão (metrotexato a 5mg/kg) e tratados com extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg frente ao Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180 estão representados no gráfico 1 e 2 respectivamente.

Os animais portadores de Carcinoma tratados com extrato hidroalcoólico das folhas de *A. indica* na dose de 250mg/kg/v.o apresentaram uma redução do tumor discretamente significativa de 63,8% e não significativa do grupo tratado com 500mg/kg de 18%, quando comparada com ao controle. Os que foram tratados com a dose de 1000mg/kg, verificamos um aumento não significativo nos pesos dos tumores de forma semelhante ao grupo controle, sugerindo uma limitação da dose. O grupo de animais tratados com metrotexato apresentou uma redução discretamente significativa de 63,1% no peso dos tumores quando comparado com o grupo controle.

Em relação aos animais portadores de Sarcoma o índice de inibição do tumor nas doses de 500 e 1000mg/kg/v.o foi de 25,2% e 30% (não significativa). Os animais tratados com a 250mg/kg apresentaram um aumento não significativo do peso dos tumores. Houve uma diminuição estatisticamente significativa de 66% no peso dos tumores do grupo tratado com metrotexato.

Macroscopicamente, os animais com tumor de Ehrlich do grupo controle apresentaram hipertrofia do fígado e baço e modificação na coloração dos rins. Nos animais do grupo padrão todos os órgãos apresentaram mudanças na coloração e hipertrofia do baço. Nos animais tratados com extrato foram observadas alterações como hipertrofia do fígado, baço e dos rins e regiões com necrose e pontos hemorrágicos. Tais alterações ficaram mais evidentes com o aumento da dose administrada nos animais tratados com extrato hidroalcoólico de *A. indica*. Nos animais com

Sarcoma apresentaram as mesmas alterações nos grupos controle, padrão e tratados, porém áreas necróticas e pontos hemorrágicos foram mais evidentes na dose de 250mg/kg.

Nos animais tratados, os tumores apresentaram-se bem delimitados, com consistência sólida e no grupo padrão foi observada uma redução dos tumores (TABELA 1).

Todos os animais tratados com metrotexato apresentaram intensa diarreia e perda de peso corporal.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos a descoberta de produtos naturais como agente antineoplásicos tem proporcionado novos campos de pesquisas no combate ao câncer. A vincristina e a vinblastina são exemplos de substâncias antineoplásicas derivadas da espécie *Vinca peruviana* e amplamente utilizada no tratamento quimioterápico (SILVA, 2002, GOODMAN; GILMAN, 2003).

Estudos científicos comprovam a importância de frutas e vegetais na dieta da população como forma de prevenir o câncer (MURAKAMI *et al.*, 1996).

Segundo Dasgupta *et al* (2004), verificou frente à linhagem papiloma uma inibição tumoral de 51,76% (250mg/kg) e 37,50% (500mg/kg) do extrato hidroalcoólico das folhas de nim, administrados por via oral, no tratamento de câncer de pele em camundongos. No mesmo trabalho, foi verificada, nas doses de 250 e 500mg/kg uma redução de 61,32% e 53,58% respectivamente no tratamento de câncer de estômago.

Flavonóides, Alcalóides e limonóides são metabólitos secundários presentes nas folhas de *A. indica* (ROSS, 2003). Vários estudos têm demonstrado o potencial dos flavonóides no tratamento de câncer, já foram descritas a inibição da incidência de papiloma de pele, em cobaias e a inibição de fibrossarcoma em camundongos (SIMÕES *et al.*, 2004, KUMAR *et al.*, 2006).

Segundo Kumar *et al* (2006), os liminóides presentes nas folhas de nim apresentaram efeito citotóxico para o neuroblastoma em ratos e para o osteosarcoma em humanos.

De acordo com os resultados obtidos o EHA das folhas de *A. indica* não apresentaram efeito significativo na redução dos pesos dos tumores nas doses administradas (250, 500 e 1000mg/kg/v.o) sugerindo que o tipo de solvente utilizado (hidroalcoólico) não foi capaz de extrair as substâncias que são conhecidas por apresentar atividade antitumoral e que estão presentes na *A. indica* (Flavonóides, Alcalóides). Na extração com solvente hidroalcoólico as substâncias preferencialmente extraídas é a saponina (SIMÕES *et al.*, 2004)

A inibição do crescimento de um novo vaso sangüíneo pode prevenir o crescimento ou progressão de um tumor benigno. O crescimento de novos vasos sanguíneos é necessário para a nutrição das células que estão se multiplicando. Deste modo, a interrupção do tumor associado com a inibição da angiogênese poderia inibir o crescimento do tumor com baixa toxicidade sistêmica e impedir a resistência das células tumorais às drogas antineoplásicas (STEELE; KELLOF, 2005)

Os efeitos observados nos animais tratados com metrotexato estão de acordo com a literatura que relata que até 90% de uma dose são excretados na urina dentro de 12 horas. Portanto o fármaco não é metabolizado e os níveis séricos são proporcionais à dose, contanto que a função renal e o estado de hidratação sejam adequados. Também foi constatada a ocorrência perda de peso corporal e diarreia intensa. (SILVA, 2002, GOODMAN & GILMAN, 2003).

A diferença de ação do extrato frente às duas linhagens tumorais provavelmente é devido à origem e a fisiologia dos tumores. Vale ressaltar que tumores do tipo sarcomatosos são mais difíceis tratar, porque afetam regiões de tecidos ósseos e músculos. (ALMEIDA *et al*, 2005).

O Crescimento do fígado e baço nos animais portadores de Carcinoma e Sarcoma tratados com extrato de *A. indica* nos conduz a estudos histológicos para analisar a origem da alteração, se

foi devido ao tratamento com o extrato da planta ou devido à presença do tumor, uma vez que tais alterações também foram observadas no grupo controle.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss nas doses de 250, 500 e 1000mg/kg não apresentaram redução significativa dos tumores Carcinoma de Erhlich e Sarcoma 180. Portanto, sugere-se um estudo com outras linhagens tumorais, doses menores do extrato, bem como alertar a população que utiliza este vegetal para complicações gastrointestinais e antiinflamatório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALMEIDA, V.L. *et al.* 2005. Câncer e Agentes antineoplásicos ciclo-celular específico e ciclo-celular não específico que interagem com o DNA: Uma Introdução. *Química Nova*, v. 28, n.1, p 118-129.
2. AZADIRACHTA INDICA. Disponível em: http://www.plantamed.com.br/pg/textos/nca/azadirachta_indica.htm acessado em 11 de novembro de 2004.
3. BEÇAK W, PAULETA J. *Técnicas de citologia e histologia*. Rio de Janeiro. Livros Técnicos e Científicos. 1976.
4. CÂNCER. Disponível em < <http://comvisa.anvisa.gov.br/>> acessado em 28 de abril de 2008.
5. CHATTOPADHYAY, R. R. 1997. Effect of *Azadirachta indica* hidroalcoholic leaf extract on the cardiovascular system. *Gen. Pharmac.* Vol. 28, 3, 449 -451.
6. DAGLI, MLZ. *Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: Estudo experimental*. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia) USP. São Paulo. 148, 1989.
7. DASGUPTA, T, BANERJEE, T, YADAVA, P.K, RAO, A.R. 2004. Chemoprotetive potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 23 – 36.
8. GOODMAN & GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10º ed. Rio de Janeiro: McGraw- Hill, 2003. 1646p.
9. JOLY, B. A. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Editora Nacional, 2002, 777p.

10. KOMIYAMA K, FUNAYAMA S. *Antitumor agents*. In: The search for bioactive compounds from microorganisms. Ed. Satoshi Omura, Spriger-Verlag, New York. cap 5, p: 79-97, 1992.
11. MARTINEZ, S. S. O Nim – *Azadirachta indica* – natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 142p, 2002.
12. MURAKAMI, A, OHOGASHI, H, KOSHIMUZU, K. 1996. Antitumour promotion with food phtochemicals: strategy for câncer chemoprevention. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 60, 1-8.
13. MURRAY, M, BIRDSALL, T, PIJZORNO, J.E, REILLY, P. *Como prevenir e tratar câncer com medicina natural*. Ed Best Seller. Rio de Janeiro. p.73-74, 2005.
14. ROSS, I. A. *Medicinal plants of the world chemical constituents traditional and modern uses*. New Jersey: Humana Press; 2003. p.315-328.
15. SILVA, P. *Farmacologia*. 6º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1374p
16. SODEPAZ – SOLIDARIDAD PARA EL DESARROLLO Y LA PAZ. Disponível em: <<http://www.sodepaz.org/nim/>> acessado em 17 de fevereiro de 2006.
17. SUBRAMANIAN, M. A., LAKSHMANAN, K. K., 1996. *Azadirachta indica* A. Juss. Stem bark as an anti-leprosy source. In: Singh, R. P., Chari, M. S., Raheja, A. K., Kraus, W (Eds.), *Neem and Environment*, vol. 2. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New delhi, pp.1143-1150.
18. STEELE, V.E, KELLOFF, G.J. 2005. Development of câncer chemppreventive drugs base don mechanistic approaches. *Mutation Research*. 519, 16-23.
19. STOCK C.C, CLARKE D.A, PHILIPS F.S, BARCLAY R.K., 1955. Sarcoma 180 inhibition screening data. *Cancer Research Sup*. N2: 179-331.

20. WINKALER, E.U *et al.* Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish of *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007.

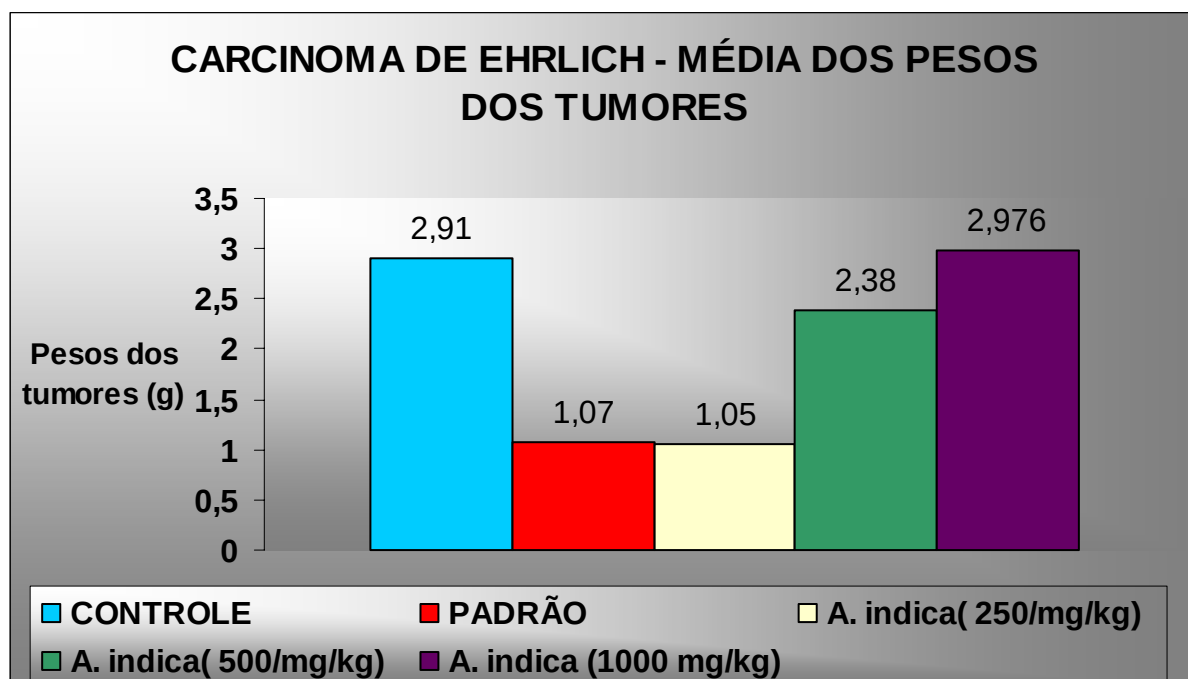


GRÁFICO 1 : Média dos pesos do tumores para o Carcinoma de Ehrlich. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ comparados os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina 0,09%. Teste “*t*” de student (n=5).

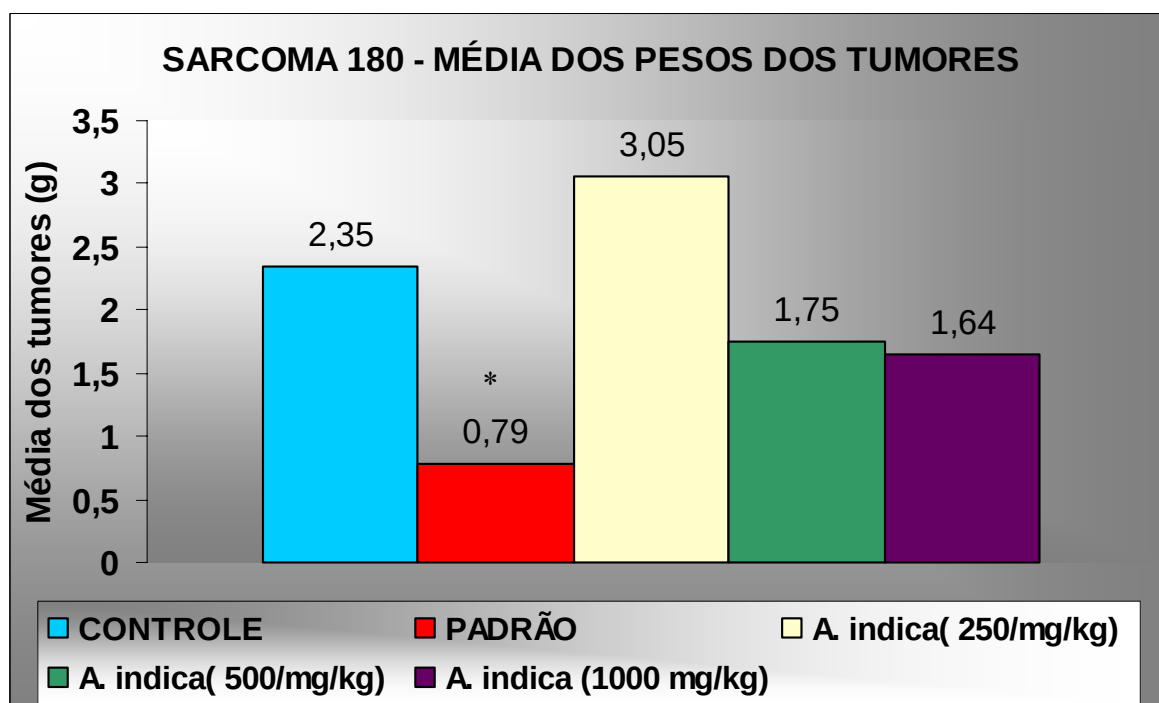


GRÁFICO 2 : Média dos pesos do tumores para o Sarcoma 180. Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ comparados os grupos tratados com o controle que recebeu apenas solução salina 0,09%. Teste “*t*” de student (n=5).

TABELA 1: Descrição macroscópica dos tumores Carcinoma de Ehrlich e Sarcoma 180, nos grupos controle, padrão e tratados com extrato das folhas de *A. indica* nas doses 250, 500 e 1000mg/kg de acordo com Dagli (1989).

SUBSTÂNCIA ADMINISTRADA	CARCINOMA DE EHRlich	SARCOMA 180
SALINA 0,09%	Tumor altamente vascularizado, invasivo, consistência sólida	Tumor vascularizado, invasivo, consistência sólida
METROTEXATO (5mg/kg)	Tumor com pontos hemorrágicos e formação de ascite	Tumor com pontos hemorrágicos e formação de ascite
<i>A. indica</i> (250mg/kg)	Pouco vascularizado, bem delimitado, consistência sólida	Altamente vascularizado, invasivo, consistência sólida
<i>A. indica</i> (500mg/kg)	Vascularizado, pouco invasivo, consistência sólida	Vascularizado, pouco invasivo, consistência sólida
<i>A. indica</i> (1000mg/kg)	Altamente vascularizado, invasivo, consistência sólida	Pouco vascularizado, bem delimitado, consistência sólida

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, concluímos que:

- Segundo os dados obtidos na DL_{50} , o EHA das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss pode ser considerado atóxico quando administrado por via oral.
- Em relação a CL_{50} , a taxa de mortalidade de *Artemia Salina* cresceu progressivamente com o aumento da dose do EHA e a CL_{50} encontrada foi de 617,25537 $\mu\text{g/ml}$, indicando que o extrato das folhas de A. indica é moderadamente tóxico frente a *Artemia salina*
- A administração por via oral em do EHA das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss em *Rattus novergicus* apresentou significativamente efeito edematogênico em todas as doses administradas (250, 500, 1000mg/kg).
- O extrato hidroalcoólico das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss nas doses de 250, 500 e 1000mg/kg não apresentaram redução significativa dos tumores Carcinoma de Erhlich e Sarcoma 180.

8. Referências Bibliográficas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGRA, M.F. *Plantas da medicina popular dos cariris velhos* - Paraíba – Brasil: espécies mais comuns. João Pessoa: União, 1996. 125 p.
2. ALBERTS, B, BRAY, D, LEWIS, J, RAF, F.M, ROBERTS, K, WATSON, J.D. *Biologia Molecular da célula*. 3º ed, 1997.
3. ALMEIDA, V.L. *et al.* 2005. Câncer e Agentes antineoplásicos ciclo-celular específico e ciclo-celular não específico que interagem com o DNA: Uma Introdução. *Química Nova*, v. 28, n.1, p 118-129.
4. ALZUGARAY, D, ALZUGARAY, C. *Ervas medicinais*. São Paulo: grupo de comunicação três, 1983.
5. ANDRADE, S.F, CARDOSO, L.G.V, CARVALHO, J.C.T, BASTOS, J.K. 2007. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populonoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *Journal of Ethnopharmacology*. Vol 109, 464-471.
6. AZADIRACHTA INDICA. Disponível em:< http://www.plantamed.com.br/pg/textos/nca/azadirachta_indica.htm > acesso em 11 de novembro de 2004.
7. BANCO DE DADOS DO HORTO DE PLANTAS MEDICINAIS DA UFC (CEME/FCPC), Fortaleza, 1986 (Inédito).
8. BALMÉ, F, SARZANA, SB. *Plantas medicinais*. São Paulo: Hemus, 127p, 2004.
9. BANDOYOPADHYAY, U, KAUSHIK, B, SENGUPTA, A, MOITRA, P, DUTTA, P, SARKAR, D, DEBNATH, P, GANGULUY, C.K, RANAJIT, B.K. 2004. Clinical studies on the effect of Neem (*Azadiractha indic*) bark extract on gastric secretion and gastroduodenal ulcer. *Life Sciences* 75, 2867 – 2878.

10. BARROS, S.B, DAVINO, S.C. *Avaliação da toxicidade*. In: OGA, S. (Editor) Fundamentos da toxicologia, 2ed. São Paulo: Atheneu Editora, p 59 – 63 2003.
11. BEÇAK W, PAULETA J. *Técnicas de citologia e histologia*. Rio de Janeiro. Livros Técnicos e Científicos. 1976.
12. BERTOLLO, C.M. *Avaliação da atividade da riboflavina em diferentes modelos de nocicepção e inflamação*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2006.
13. BUCCHI, D.F. *Efeitos do medicamento homeopático método Canova em camundongos normais e portador de tumor sarcoma 180*. Dissertação (compilação de duas teses de mestrado). Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Curitiba/ PR. 2002.
14. CÂNCER. Disponível em < <http://comvisa.anvisa.gov.br/>> acessado em 28 de abril de 2008.
15. CARVALHO, J.T.C., ALMANÇA, C.C.J., *Formulário de Prescrição Fitoterápica*. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 166p.
16. CHATTOPADHYAY, R.R, 1997. Effect of *Azadirachta indica* hidroalcoholic leaf extract on the cardiovascular system. Gen. Pharmac. Vol. 28, 3, 449-451, 1997.
17. CÔRREA, M. PIO. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Vol III, 1984.
18. COWLDY, EV. *Câncer Research*. In: SAUNDERS, WB ORG, Cancer cells. Philadelphia, p 546-574, 1955.
19. DANTAS, D.A., MAGANHA, M., *et al*; Estudo fitoquímico dos frutos de *Melia azedarach* L. (Cinamomo, Meliaceae). In Encontro de Pesquisa e iniciação científica da UNIDERP, 2.,

- Campo Grande, 2000. Anais..., Campo Grande: UNIDERP, p 119-120, 2000. Resumo expandido.
20. DAGLI, M.L.Z. *Disseminação linfática do tumor de Ehrlich: Estudo experimental*. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia) USP. São Paulo. 148, 1989.
21. DASGUPTA, T, BANERJEE, T, YADAVA, P.K, RAO, A.R. 2004. Chemoprotective potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems. *Journal of Ethnopharmacology* 92, 23-36.
22. DAVID, J.P.L, DAVID, J.M, 2002. *Plantas Medicinais. Fármacos derivados de plantas*. In: SILVA, P, 2002. Farmacologia. 6º ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil. P 135 – 145.
23. DE ALMEIDA, V.L, LEITÃO, A, REINA, L.C.B, MONTANARI, C.A, DONNICI, C.L. 2005. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo celular específico e não específico que interagem com o DNA: uma introdução. *Química nova* 28 (1) 118 – 119.
24. FITOTERAPICO. Disponível em:< <http://www.herbario.com.br/bot/plantmed/fitoter.htm> > acessado em 07 de setembro de 2005.
25. FREEDMAN, P. & WADDINGTON, C. H. *The principles of science research*. 2o ed rev. Oxford: Pergamon, 1960, 227p
26. GARLET, T.M.B, IRGANG, B.E. 2001; Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil, no período de fevereiro de 1999 a julho de 1999. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 4 (1), p. 9-18.
27. GOODMAN & GILMAN. *As bases farmacológicas da terapêutica*. 10º ed. Rio de Janeiro: McGraw- Hill, 2003. 1646p.

28. HARIKRISHMAN, R, RANI, M.N, BALASUNDARAM, C, 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp. *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221, 41 – 50.
29. HILL, AF. Economic botany. 2nd ed. New Delhi, Harvard University: TATA McGraw-Hill, 1972, 560 p.
30. ISSELBACHER, K.J, BRAUNWALD, E, WILSON, J.D. *Medicina interna*. 13^o ed. México: Nueva Editorial Interamericana, vol 1, p 391 – 409, 2005.
31. ISMAN, M.B, KOUL, O, LUCZYSKI A, KAMINSKI, J, 1990. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *J. Agric. Food. Chem.* 38, 1406 – 1411.
32. JACKAI, L.E.N, INANG, E.E, NWOBI, P, 1992. The potencial for controlling post-flowering pests of cowpea, *Vigna unguiculata* Walp. Using neem, *Azadirachta indica* A Juss. *Trop. Pest Manag. Sci.* 38, 56 -60.
33. JOLY, B. A. *Bot nica: introdução   taxonomia vegetal*. São Paulo: Editora Nacional, 2002, 777p.
34. KLAASEN, C.D, AMDUR, M.A, DOULL, J. Casarettand Doull's : *Toxicology the basis scienc of poisons*. 5^o ed. New York: McGraw Hill, 1996.
35. KOMIYAMA K, FUNAYAMA S. *Antitumor agents*. In: The search for bioactive compounds from microoganisms. Ed. Satoshi Omura, Spriger-Verlag, New York. cap 5, p: 79-97, 1992.
36. KUMAR, S, SURESH, P.K, VIJAYABABU, M.R, ARUNKUMAR, A, ARUNAKARAN, J. 2006. Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC - 3). *Journal of Ethnopharmacology* 105, 246 – 250.
37. LARINI, L. *Toxicologia*. 3^o ed. São Paulo: Manole, 1997. p. 301

38. LOOMIS, M.D, HAYES, A.W. *Loomi's essentials of toxicology* 4º ed Califórnia: Academic Press, 1996.
39. LORENZI, H, MATOS, F.J.A. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas*. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, 512 p.
40. LUCENA J.E.X, BISPO M.D, NUNES R.S, CAVALCANTI S.C.H, TEIXEIRA-SILVA F, MARÇAL R.M, ANTONIOLLI A.R. 2006. Efeito Antinociceptivo e Antiinflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schum (Rubiaceae). *Rev. Bras Farmacognosia* 16 (1), 67 – 72.
41. MALONE, M.H. *Natural products drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*, 1977.
42. MARTINEZ, S.S. O Nim – *Azadirachta indica* – natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: IAPAR, 142p, 2002.
43. MARTINS, E. R. *et al. Plantas medicinais*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998, 220 p.
44. MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais: guia de seleção de plantas medicinais do Nordeste do Brasil*. Fortaleza: IOCE, v. II, p. 144. 1989.
45. MEYER B.N, FERRIGNI N.R, PUTNAM J.E, JACOBSEN L.B, NICHOLS D.E, MCLAUGHLIN J.L 1982. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 45: 31-34.
46. MURAKAMI, A, OHOGASHI, H, KOSHIMUZU, K. 1996. Antitumour promotion with food phtochemicals: strategy for câncer chemoprevention. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 60, 1-8.
47. MURRAY, M, BIRDSALL, T, PIJZORNO, J.E, REILLY, P. *Como prevenir e tratar câncer com medicina natural*. Ed Best Seller. Rio de Janeiro. p.73-74, 2005.

48. NEEM. Disponível em< <http://pt.wikipedia.org/wiki/Neem> > acessado em 04/03/2008.
49. PANIZZA, S. *Plantas que curam (cheiro de mato)*. 26^a ed., São Paulo: IBRASA – Instituição Brasileira de Difusão Cultural, p. 31-32, 2002.
50. PAVAN-FRUEHAUF, SANDRA. *Plantas medicinais da mata atlântica: manejo sustentado e amostragem*. São Paulo: Annablume: Fapesp, 2000. 216p.
51. RIBEIRO, M. N. S. et al. *Cadastro fitoquímico brasileiro*. 2º ed. Manaus: INPA/FUA, 1987.
52. ROSS, I. A. *Medicinal plants of the world chemical constituents traditional and modern uses*. New Jersey: Humana Press; 2003. p.315-328.
53. SANCHEZ-MATEO, C.C, BONKANKA, C.X, HERNÁNDEZ-PÉREZ, M, RABANAL, RM. 2006. Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil. *Journal of Ethnopharmacology*. v. 107, p 1-6.
54. SAUVIAT, M-P. Effect des neurotoxines sur l'activité électrique et la contraction du muscle cardiaque. *C. R. Société de Biologie*, v. 1919 (3), p. 451-471. 1977.
55. SCHULTZ, A. R. H. *Introdução à botânica sistemática*. V. II, Porto Alegre: Editora da Universidade. 4^a ed. p. 414. 1984.
56. SCHVARTSMAN, S. *Produtos químicos de uso domiciliar – segurança e riscos toxicológicos*. São Paulo: Almed, 1992, 92p.
57. SEGOTTAYAN, S.N, MAN Y.C, CHAE, H.P, HONG, Y.S, JAE, D.K, SEOK M.K, 2007. The toxic effects of neem extract and azadirachtin on the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stål) (BPH) (Homoptera: Delphacidae). *Chemosphere*. 67, 80–88.
58. SENTHIL, N.S, KALAIVANI, C.K., MURUGAN, K. 2006. The toxicity and behavioural effects of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) the rice leafhopper. *Chemosphere* 62, 1381-1387

59. SIDDIQUI, B.S, AFSHAN, F, GULZAR, T, HANIF, M. 2004 Tetracyclic triterpenoids from the leaves of *Azadirachta indica*. *Phytochemistry*, 65, 236 –2367
60. SIGIURA, K. *Tumor transplatation*. In: GAY W. Methods of animal experimentation. New York: Academic Press. P 177 – 222, 1965.
61. SILVA, M.C, CARVALHO, J.C.T. Inflamação. In: CARVALHO, J.C.T. *Fitoterápicos antiinflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. Ribeirão Preto, SP. Ed Tecmed, 2004.
62. SILVA, P. *Farmacologia*. 6º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1374p.
63. SILVA, R.R, OLIVEIRA, T.T, NAGEM, T.J, LEÃO, M.A. 2002. Efeito de flavonóides no metabolismo do ácido araquidônico. *Medicina Ribeirão Preto*. Vol 35, 127 – 133.
64. SIMÕES, C.M.O, SCHENKEL, E.P, GOSMANN, G, MELLO, J.C.P, MENTZ, L.A, PETROVICK, P.R.. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2004, 1096p.
65. SINGH, S, SINGH, R.P, 1998. Neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts and azadirachtin as oviposition deterrents against the mlelon fly (*Bactrocera cucurbitae*) and the oriental fruit fly. *Phytoparasitica*. 26, 6 – 12.
66. SIQUEIRA, J.R, DANTAS, C.J.S. *Medicamentos celulares e moleculares da inflamação*. MEDSI, 225p, 2000.
67. SODEPAZ – SOLIDARIDAD PARA EL DESARROLLO Y LA PAZ < <http://www.sodepaz.org/nim/>> acessado em 17 de fevereiro de 2006.
68. STEELE, V.E, KELLOFF, G.J. 2005. Development of câncer chemppreventive drugs base don mechanistic approaches. *Mutation Research*. 519, 16-23.
69. STOCK C.C, CLARKE D.A, PHILIPS F.S, BARCLAY R.K., 1955. Sarcoma 180 inhibition screening data. *Cancer Research Sup*. n 2: 179-331.

70. SUBRAMANIAN, M. A., LAKSHMANAN, K. K., 1996. *Azadirachta indica* A. Juss. Stem bark as an anti-leprosy source. In: Singh, R. P., Chari, M. S., Raheja, A. K., Kraus, W (Eds.), *Neem and Environment*, vol. 2. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd., New delhi, p.1143-1150.
71. SUGIURA, M *et al.* 1994. Cryptic dysfunction of cellular immunity in asymptomatic human immunodeficiency vírus (HIV) carriers and its actualization by environmental immunosuppressive factor. *In vivo*. Vol 8(6), 1019 – 1022.
72. TALALAY, P & TALALAY, P. 2001. The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. *Academic Medicine* 76, 238 – 247.
73. THAKURTA, P , BHOWMIK ,P , MUKHERJEE, S , HAJRA, T.K , PATRA, A, BAG, P.K. 2007. Antibacterial, antisecretory and antihemorrhagic activity of *Azadirachta indica* used to treat cholera and diarrhea in India. *Journal of Ethnopharmacology* 111(3), 607 – 612.
74. TUROLLO, M.S.R, NASCIMENTO, E.S. 2006. Informações Toxicológicas de Alguns Fitoterápicos Utilizados no Brasil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol 42(2), abr/jun.
75. VEIGA JÚNIOR V.F, PINTO A.C. 2005. Plantas Medicinais: Cura segura? *Química Nova* 28 (3), 519 – 528.
76. WINCKELMANN, U, LUBKE, G, BROCKSTEDT, M., SCHANZ, I., DECHENT, J. I. M. Anticholinergic syndrome after ingestion of Angel's trumpet tea. *Web of Science*. v.148, p 18-22. 2000.
77. WINKALER, E.U *et al.* Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish of *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007.

78. WINTER, C.A, RISLEY, E. A, NUSS, G. W . 1962. Carrageenan – induced of edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* 111, p 544-547.