

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**EFEITO DO EXTRATO DE *Melia azedarach* L. SOBRE O SISTEMA
COLINÉRGICO EM RATOS INTOXICADOS COM METILCARBAMATO**

FABIANA SARI FERREIRA

**CASCAVEL - PARANÁ
2017**

FABIANA SARI FERREIRA

EFEITO DO EXTRATO DE *Melia azedarach* L. SOBRE O SISTEMA COLINÉRGICO EM RATOS INTOXICADOS COM METILCARBAMATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, área de concentração de Fármacos e Medicamentos como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Brugin Marek

**CASCADEL - PARANÁ
2017**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F383e

Ferreira, Fabiana Sari

Efeito do extrato de *Melia azedarach* L. sobre o sistema colinérgico em ratos intoxicados com metilcarbamato. / Fabiana Sari Ferreira. Cascavel, PR: UNIOESTE, 2017.

96 f.

Orientadora: Profª. Drª. Carla Brugin Marek

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017.

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas

1. Acetilcolinesterase. 2. Agrotóxico. 3. Flavonoides. I. Marek, Carla Brugin. II. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. III. Título.

CDD 20.ed. 615.908

CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Bejio CRB-9ª/965

FABIANA SARI FERREIRA

EFEITO DO EXTRATO DE *Melia azedarach* L. SOBRE O SISTEMA COLINÉRGICO EM RATOS INTOXICADOS COM METILCARBAMATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná como pré-requisito para obtenção do título de Mestra em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Carla Brugin Marek

BANCA EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Carla Brugin Marek
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE
Orientador



Prof^a. Dr^a. Sara Cristina Sagae
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UNIOESTE



Prof^a. Dr^a. Silmara Baroni
15^a Regional de Saúde

Cascavel - PR
2017

BIOGRAFIA RESUMIDA

Nascida em 18 de julho de 1988, Natural de Cascavel, Paraná, Brasileira, nascida em 18 de julho de 1998. Realizou curso de inglês na Escola de Idiomas CNA, e esteve por seis meses no Canadá, em 2006, onde participou de programas de trabalho voluntário nas instituições 'London Food Banc' e no 'Children's Museum', ambas localizadas na cidade de London-ON. Retornando ao Brasil, ingressou na Universidade Estadual do Oeste do Paraná e concluiu graduação em Farmácia em 2014, neste período realizou projetos de pesquisa/extensão nas áreas de Toxicologia Celular, Farmacotécnica e Cosmetologia, bem como Anatomia Humana; além de estágios extracurriculares em Dispensação, Farmácia Hospitalar e Indústria Farmacêutica. Após a graduação atuou na área de Indústria Farmacêutica no setor de Assuntos Regulatórios até 2015, quando ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, na área de concentração Fármacos e Medicamentos, concluiu o mesmo realizando pesquisas em Toxicologia Celular.

*“Dificuldades preparam pessoas
comuns para destinos extraordinários”*

(Clive Staples Lewis)

DEDICATÓRIA

À Deus, por me conceder sabedoria, proteção e me amparar nos momentos difíceis, sempre me guiando para os melhores caminhos e me dando coragem para continuar.

À minha família e familiares, que sempre estiveram ao meu lado com carinho e paciência, em especial aos meus pais, Sonia Regina Sari e Leonildo de Jesus Ferreira, que sempre confiaram em mim e me apoiaram em todos os momentos, tornando-se assim, essenciais na minha caminhada. Ao meu irmão Felipe Sari Ferreira, que também me apoiou nessa jornada, as minhas avós que sempre estão rezando e torcendo para o meu sucesso.

Agradeço a minha orientadora, Professora Doutora Carla Brugin Marek, por acreditar que eu era capaz, me mostrando o caminho da ciência, sendo exemplo de profissional e orientadora. E também, a Professora Doutora Ana Maria Itinose, que sempre se fez presente durante a pesquisa dando suporte para o que fosse necessário.

Também aos colegas do Laboratório de Toxicologia, bem como o Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular, que tiveram grande importância durante a execução deste trabalho. Aos colegas Júlio, Denise, Suélyn, Angélica e Priscila, que colaboraram em muitos momentos. Aos estagiários Luiz Guilherme, Victor e Ana Paula que deram grande amparo nas atividades diárias no laboratório.

E especialmente, às minhas colegas de turma, Ana Julia Penteado que foi minha amiga e “terapeuta” em muitas horas, e Isabella Calvo Bramattique, que me salvou em várias gavagens quando os ratos não se comportavam, a Fernanda Coleraus Silva que além das horas no laboratório, teve paciência em me ensinar muito do que eu aprendi.

Ainda, ao meu namorado Rodrigo Foscharini, que teve muita paciência comigo, principalmente nos momentos mais difíceis da minha pesquisa, me incentivando em todos os momentos.

Por fim, a todos os meus amigos que fizeram parte desta caminhada, que estiveram presentes, ou mesmo distantes, torcendo por mim e pelo o meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), com o apoio ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), além do auxílio financeiro junto a Fundação Araucária (FA), por meio da bolsa de estudos.

Aos membros do Grupo de pesquisa em Toxicologia Celular – CEATOX, os quais estiveram sempre presentes e disponíveis para auxiliar na pesquisa, juntamente com os colegas, professores e coordenação do PCF, que também deram suporte a realização de tal pesquisa; em especial à Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Marinho Jorge, e ao Prof. Dr. Helder Lopes Vasconcellos, que colaboraram com meu aprendizado e, a Prof^a. Dr^a. Sara Cristina Sagae, que com todo seu carinho me ensinou as técnicas necessárias para a execução do meu experimento.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) que, através da Prof^a. Dr^a. Maria Helena Sarragiotto, realizou as análises de ressonância magnética nuclear, que tem grande valia para este trabalho.

Aos membros da banca avaliadora, os quais são fundamentais para esta produção científica, promovendo melhores resultados e contribuindo com conhecimento científico para este trabalho.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é apresentada em formato misto, a qual consta de uma breve revisão do assunto, objetivos do trabalho, um artigo científico com dados experimentais originais e conclusão, de acordo com as normas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. O artigo científico foi formatado segundo as normas propostas pelo periódico Evidenced-Based Complementary and Alternative Medicine, nas quais o artigo será em breve submetido. Trata-se de um trabalho, cuja parte experimental foi executada no Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Estadual do Oeste do Paraná com apoio da Equipe de Pesquisa em Toxicologia Celular.

EFEITO DO EXTRATO DE *Melia azedarach* L. SOBRE O SISTEMA COLINÉRGICO EM RATOS INTOXICADOS COM METILCARBAMATO

RESUMO

Os carbamatos são produtos fundamentais para a formulação de praguicidas. Embora sua produção e a comercialização sejam com a finalidade de eliminação de insetos, a sua utilização em tentativas de suicídio é comum em nosso meio, além das intoxicações acidentais envolvendo trabalhadores rurais e crianças, devido sua propriedade toxicológica em inibir as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. A atividade destas enzimas só volta ao normal espontaneamente, assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a possível ação do extrato de folhas de *Melia azedarach* L. sobre o sistema colinérgico inibido por metilcarbamato. Foram testadas *in vitro* e *in vivo*, diferentes concentrações de extrato tamponado de *Melia azedarach* L., quanto a atividade da acetilcolinesterase inibida por metilcarbamato. Os resultados mostraram que o extrato de *Melia azedarach* L. tem potencial efeito de reversão sobre a enzima inibida pelo metilcarbamato, se tornando uma alternativa na terapia do tratamento de intoxicações com carbamatos.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase, agrotóxico, flavonoides

THE EFFECT OF EXTRACT OF *Melia azedarach* L. ON CHOLINERGIC SYSTEM OF RATS POISONED WITH METHYL CARBAMATE

ABSTRACT

Carbamates are essential products for pesticide formulation, mainly used in agriculture for the elimination of insects. Although the production and trade of carbamates are for purpose insects elimination, it is common used to suicide attempts in our environment, in addition to accidental poisonings involving rural workers and children. The toxicological property is inhibit the acetylcholinesterase and buthyrylcholinesterase enzymes which leads a severe poisoning related to cholinergic crisis. The enzymes activity get back to normal only spontaneously, so the study of new substances that can intervene directly on the active site of these enzymes when it is inhibited and reverse this toxic action is necessity for the health. Researchs with *Melia azedarach* L. (Meliaceae) has been made searching for new strategies for treatment of enzyme inhibity by methyl carbamate poisoning. Different concentrations of *Melia azedarach* L. buffered extract were tested *in vitro* and *in vivo* for acetylcholinesterase activity inhibited by methylcarbamate. The results showed that the extract of *Melia azedarach* L. has a potential reversion effect on the enzyme inhibited by methyl carbamate, becoming an alternative to treatment of carbamate intoxication

Key-words: Acetylcholinesterase, pesticides, flavonoid

SUMÁRIO

BIOGRAFIA RESUMIDA	iii
DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
APRESENTAÇÃO	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA	xi
LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO ORIGINAL	xii
LISTA DE TABELAS DO ARTIGO ORIGINAL	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
4. CAPÍTULO: ARTIGO ORIGINAL	35
5. CONCLUSÕES GERAIS	72
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
7. REFERÊNCIAS	74
7.1. Referências da Revisão de Literatura.....	74
7.2. Referências do Artigo Original	84
8. ANEXO I	88
9. ANEXO II	91

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 Fórmula geral da estrutura química dos carbamatos.	19
Figura 2 Mecanismo da inibição da colinesterase pelo inseticida carbamato.	20
Figura 3 Representação do sistema colinérgico com a liberação da acetilcolina na fenda sináptica e a ação da acetilcolinesterase.	21
Figura 4 Espécie vegetal <i>Melia azedarach</i> L.	29
Figura 5 Estrutura química da azadiractina.	30
Figura 6 Estrutura química básica dos flavonoides.	31

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO ORIGINAL

Fig. 1 Espectro de absorção no UV de diferentes concentrações do extrato tamponado de <i>Melia azedarach</i> L.	53
Fig. 2 RMN de ^1H do extrato tamponado de <i>Melia azedarach</i> L.	54
Fig. 3 Atividade da acetilcolinesterase em homogenato de cérebro de rato após a adição do extrato tamponado de <i>M. azedarach</i> em diferentes concentrações.....	58
Fig. 4 Perfil da intensidade da sintomatologia apresentada pelos ratos machos nas primeiras 4 horas. A - Após a administração de 8.000 mg.Kg^{-1} de metilcarbamato. B - Após a administração de 5.000 mg.Kg^{-1} de metilcarbamato.	62
Fig. 5 Perfil da intensidade da sintomatologia apresentada pelas ratas fêmeas nas primeiras 4 horas. A - Após a administração de 5.000 mg.Kg^{-1} de metilcarbamato. B - Após a administração de 2.500 mg.Kg^{-1} de metilcarbamato.	63
Fig. 6 Perfil da atividade da acetil- e butirilcolinesterase em ratos controle.	64
Fig. 7 Perfil da atividade da acetil- e butirilcolinesterase em ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} . Os valores são a diferença entre as atividades dos tempos de 5 a 120 minutos e o tempo “0” minutos quando comparados com o grupo controle (atividade basal).	65
Fig. 8 Perfil da atividade da acetilcolinesterase. A: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} e tratados com extrato de <i>M. azedarach</i> 125 mg.Kg^{-1} . B: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} . C: Ratos tratados apenas com <i>M. azedarach</i> 125 mg.Kg^{-1}	66
Fig. 9 Perfil da atividade da acetilcolinesterase. A: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} e tratados com extrato de <i>M. azedarach</i> 250 mg.Kg^{-1} . B: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} . C: Ratos tratados apenas com <i>M. azedarach</i> 250 mg.Kg^{-1}	67
Fig. 10 Perfil da atividade da butirilcolinesterase. A: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} e tratados com extrato de <i>M. azedarach</i> 250 mg.Kg^{-1} . B: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} . C: Ratos tratados apenas com <i>M. azedarach</i> 250 mg.Kg^{-1}	68
Fig. 11 Perfil da atividade da butirilcolinesterase. A: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} e tratados com extrato de <i>M. azedarach</i> 125 mg.Kg^{-1} . B: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} . C: Ratos tratados apenas com <i>M. azedarach</i> 125 mg.Kg^{-1}	69
Fig. 12 A: Atividade da acetilcolinesterase no cérebro. B: Atividade da butirilcolinesterase no fígado. (Concentrações do Extrato de <i>Melia azedarach</i> L. expressas em mg.Kg^{-1})	70

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO ORIGINAL

Tabela 1 Percentuais de eritrócitos intactos e de hemólise do extrato tamponado de <i>M. azedarach</i>	55
Tabela 2 Percentuais de mortalidade do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> frente a diferentes concentrações do extrato tamponado de <i>M. azedarach</i>	56
Tabela 3 Atividade da acetilcolinesterase após diferentes tempos de incubação com 45 mM de metilcarbamato.....	57
Tabela 4 Atividade da acetilcolinesterase após a adição de 1,0 mg.mL ⁻¹ de extrato tamponado de <i>M. azedarach</i> em homogenatos de cérebro de ratos incubados com 45 mM de metilcarbamato.....	59
Tabela 5 Atividade da acetilcolinesterase após a adição de 2,0 mg.mL ⁻¹ de extrato tamponado de <i>M. azedarach</i> em homogenatos de cérebro de ratos incubados com 45 mM de metilcarbamato.....	60
Tabela 6 Análise qualitativa do número de mortes e sintomatologia apresentada por ratos submetidos a intoxicação por metilcarbamato.....	61

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ACh – Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BuCh – Butirilcolina
BuChE – Butirilcolinesterase
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEATOX – Centro de Assistência em Toxicologia
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
Ch – Colina
DL50 – Dose letal de 50%
DTNB – ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EC – Enzyme Commission Numbers
EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EPI – Equipamento de proteção individual
FA – Fundação Araucária
KCl – Cloreto de Potássio
M. azedarach – *Melia azedarach*L.
NaCl – Cloreto de Sódio
NTE – Neuropatia
NTP – National Toxicology Program
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Tampão Fosfato Salino
PCF – Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Ptna - Proteína
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
SEM – Erro padrão da méridia
SINITOX – Sistema Nacional de Informação Tóxico-Farmacológicas
UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
UV – Ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

Os carbamatos são produtos fundamentais para a formulação de praguicidas, utilizados principalmente na lavoura para o extermínio de insetos. Embora a produção e a comercialização dos carbamatos sejam com a finalidade de eliminação de insetos, a sua utilização em tentativas de suicídio é comum em nosso meio. Além de que, o seu caráter extremamente tóxico o torna perigoso quando utilizado irregularmente em nível domiciliar, enquanto raticida. Dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX), mostram a gravidade dos casos de tentativa de suicídio, além das intoxicações acidentais envolvendo trabalhadores rurais e crianças.

A sintomatologia nas intoxicações por carbamatos se apresentam rapidamente após a ingestão ou o contato com o produto. Isto, por sua absorção acontecer de forma rápida, e praticamente por completa, distribuindo-se pelo organismo de forma a atingir vários tecidos. Ao atingirem o sistema nervoso central e periférico, bem como o sistema respiratório, podem levar a morte em minutos se não tratado em tempo.

A sua propriedade toxicológica em inibir as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, leva, frequentemente, a quadros graves de intoxicação relacionados à crise colinérgica, acarretando no internamento do intoxicado em unidades de terapia intensiva, para receber o suporte adequado para o tratamento. Apesar de parte do tratamento sera administração de atropina, a atividade destas duas enzimas continua inibida, já que a atropina não tem ação sobre o sítio ativo destas enzimas, mas sim ação direta nos receptores muscarínicos.

A atividade das enzimas só volta ao normal espontaneamente, o que demanda tempo de internamento e tratamento. Assim, o estudo de novas substâncias que possam intervir diretamente sobre o sítio ativo destas enzimas, quando inibidas, e reverter esta ação tóxica, é uma necessidade para a área da saúde. Desta forma, *Melia azedarach* L., tem sido alvo de estudos, pois apresenta efeito sobre o sistema colinérgico. Esta planta, popularmente conhecida como cinamomo, pertence à família Meliaceae cuja característica é apresentar vegetais que sintetizam metabólitos secundários, além de já terem sido identificados diversos compostos bioativos em seus extratos.

Alguns compostos como os alcaloides, as saponinas e os limonoides, caracterizam a *M. azedarach* como neurotóxica, causando conseqüentemente, diversos efeitos. Mas, apesar desta planta apresentar características de uma planta

tóxica, a mesma, pode ainda, ter efeitos benéficos relacionados com o sistema nervoso, tanto central como periférico. Como exemplo, os compostos de natureza flavônica que apresentam importantes efeitos no organismo, incluindo ação sobre as colinesterases. Devido a este comportamento heterogêneo, a busca em encontrar novas substâncias que auxiliem no tratamento das intoxicações por carbamatos foi investigada. Assim, a compreensão das características e efeitos decorrentes da intoxicação por carbamatos, permitirão o estudo de substâncias que possam intervir diretamente sobre o sítio ativo das colinesterases, quando inibidas pelos carbamatos, e mais ainda, reverter a ação tóxica, o que tornar-se-á um ganho para a área da saúde.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Obtenção e avaliação do efeito do extrato tamponado de folhas verdes de *Melia azedarach* L., sobre a atividade colinérgica em ratos intoxicados com metilcarbamato.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Caracterizar o extrato tamponado de *M. azedarach*;

2.2.2. Testes *in vitro*:

- Verificar *in vitro* a toxicidade do extrato tamponado de *M. azedarach*;
- Determinar *in vitro* a curva da atividade da acetilcolinesterase após a adição do extrato tamponado de *M. azedarach*;
- Determinar *in vitro* a atividade da acetilcolinesterase após a adição de metilcarbamato;
- Verificar *in vitro* o efeito do extrato tamponado de *M. azedarach* sobre a atividade da acetilcolinesterase em homogenato tratado com metilcarbamato;

2.2.3. Estabelecer *in vivo* um modelo experimental de rato intoxicado de forma aguda com metilcarbamato;

- Reconhecer os sintomas característicos da crise colinérgica intoxicação aguda por metilcarbamato no modelo experimental;
- Medir a atividade da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase no sangue do modelo experimental intoxicado por metilcarbamato;
- Buscar estabelecer o período de administração do extrato tamponado de *M. azedarach* em um modelo experimental intoxicado por metilcarbamato;

2.2.4. Avaliação do extrato tamponado de *Melia azedarach* L. em animais envenenados com metilcarbamato

- Avaliar o efeito do extrato sobre a sintomatologia em um modelo experimental intoxicado por metilcarbamato;
- Avaliar o efeito do extrato sobre a atividade da acetilcolinesterase em um modelo experimental intoxicado por metilcarbamato.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Características Toxicológicas dos Carbamatos

Os carbamatos são derivados do ácido carbâmico, enquanto o metilcarbamato é um metil éster, comercialmente, produzido através da reação entre a amônia e o cloroformiato de metila, resultando em um composto cristalino de coloração branca e solúvel, principalmente em água (NTP, 1987), Figura 1.

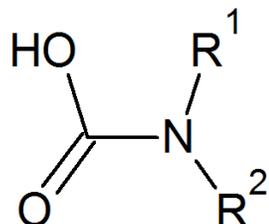


Figura 1 Fórmula geral da estrutura química dos carbamatos.

Fonte: Adaptado de SILVA, 2010.

Este produto é fundamental para a formulação de agrotóxicos, como o Aldicarb, comumente conhecido como “chumbinho”. O Aldicarb (Temik 150®, Bayer Cropsciences) era, até 2012 o único produto da classe dos carbamatos autorizado no comércio brasileiro para uso exclusivo na agricultura, seja na forma de inseticida, acaricida, ou nematicida (DE SIQUEIRA et al., 2015). Porém, devido a sua elevada toxicidade, e por ser o produto mais utilizado de forma irregular, como raticida doméstico. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) banuiu-o do mercado. No entanto, o produto comercializado de forma clandestina continua sendo perigoso para a população (ANVISA, 2012).

Sintetizado por L.K. Payne e M.H.J. Weiden em 1965, o Aldicarb chegou ao mercado em 1970 com seu uso voltado às culturas de algodão (LARINI, 1999). Além dele, existem vários outros produtos como o Carbaril, Carbofuran, Fenoxicarb, Metiocarb, Metomil, Oxamil e Primicarb, que também são pertencentes a classe dos carbamatos e são utilizados de forma generalizada nas últimas décadas para eliminar os insetos e parasitas das plantas, a fim de manter a produtividade da agricultura em alta (RAPINI & MARRAZZA, 2016).

Em virtude desses produtos ainda serem comumente utilizados em casas, jardins e na agricultura como inseticidas, a conseqüente exposição torna-se uma ameaça, visto que, os carbamatos são facilmente absorvidos e distribuídos no organismo (CCIN, 2000). Através da via oral, encontram-se os principais casos de

intoxicações agudas nos atendimentos emergenciais. Estes casos podem ocorrer tanto pela ingestão intencional nas tentativas de suicídio, ou ainda, de forma acidental, geralmente envolvendo crianças (BERTOLOTE et al., 2006).

Embora a via oral leve à maior absorção destes compostos, a intoxicação aguda pelos carbamatos pode ocorrer também pelas vias respiratória e dérmica. Esses casos são originados, na maioria das vezes, a partir de acidentes ocupacionais, onde os trabalhadores rurais se expõem ao manipularem estes produtos na aplicação agrícola. Esta exposição, no entanto, pode ser elevada quando o manuseio é feito de forma incorreta e sem a utilização de equipamentos de proteção individual, (EPI), necessários (HOFFMAN et al., 2009). A absorção destes compostos acontece de forma rápida, e praticamente completa, e a sua distribuição no organismo se dá de forma a atingir vários tecidos. A sua biotransformação acontece principalmente no fígado, por hidrólise enzimática (HUANG et al., 1993), e seus metabólitos são excretados pelos rins e, em menor proporção através da bile (NOMEIR et al., 1989).

O mecanismo de ação dos carbamatos está relacionado à inibição da acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7), e da butirilcolinesterase (BuChE, EC 3.1.1.8) no inseto. A inibição destas enzimas, causa o acúmulo da acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, levando a permanente ativação do sistema colinérgico via receptores muscarínicos e nicotínicos, causando a morte do inseto por interrupção da transmissão neuronal (SHAO et al., 2013).

Esta inibição acontece pela formação de um complexo enzima-inibidor, formado pela ligação do carbamato com o sítio ativo da enzima, levando a formação de uma enzima carbamilada, Figura 2. Esta, por sua vez, apesar de ser relativamente estável, pode ser hidrolisada espontaneamente até que a enzima volte na sua forma original, descarbamilada (BARON, 1994).

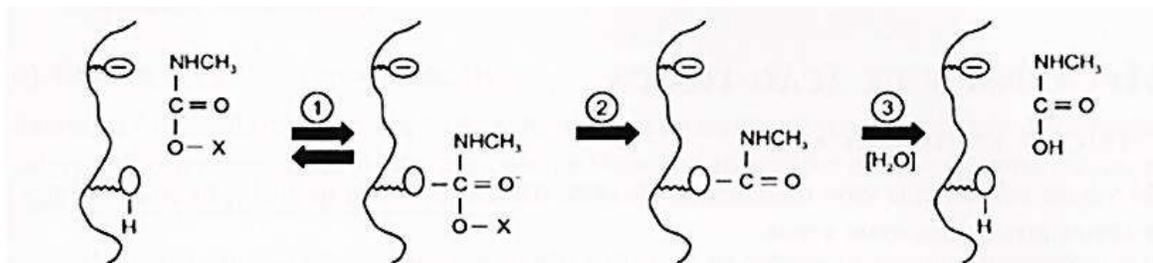


Figura 2 Mecanismo da inibição da colinesterase pelo inseticida carbamato.

Fonte: MÍDIO & SILVA, 1995.

No entanto, este mecanismo de ação dos carbamatos não é seletivo para os insetos, podendo atuar da mesma forma sobre as colinesterases dos animais, incluindo dos humanos (ROSMAN et al., 2009). Esta inibição, da mesma forma que nos insetos, leva ao acúmulo de acetilcolina. Como consequência, tem-se a crise colinérgica, quadro característico da intoxicação, pela constante estimulação dos receptores colinérgicos (WESSELING et al., 2002).

Os receptores colinérgicos são divididos em dois grupos, os nicotínicos e os muscarínicos, os quais são formados por canais iônicos regulados por ligantes, neste caso a acetilcolina, que atua como o neurotransmissor. Esta é liberada na fenda sináptica, através de um potencial de ação. Uma vez na fenda sináptica, a acetilcolina precisa ser removida de forma rápida para que ocorra a repolarização. Em seguida, ocorre a sua hidrólise em acetato e colina (Ch) pela acetilcolinesterase (SILVA, 2010), Figura 3.

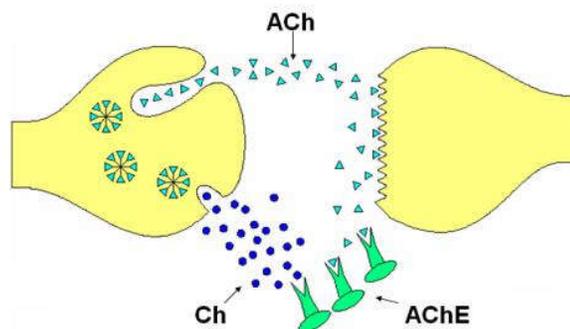


Figura 3 Representação do sistema colinérgico com a liberação da acetilcolina na fenda sináptica e a ação da acetilcolinesterase.

Fonte: PETRONILHO & FIGUEROA-VILLAR, 2014.

A acetilcolinesterase é, portanto, uma importante enzima responsável na manutenção do sistema colinérgico ao catalisar a hidrólise da acetilcolina. Essa reação catalítica acontece por meio de um mecanismo envolvendo diversos passos, estes permitem a cessação do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas (ZHOU, WANG & ZHANG, 2010). Sua elevada atividade no sistema nervoso central se faz característica, atuando principalmente nos neurônios motores e sensoriais. No entanto, como todo o organismo é dependente da neurotransmissão para o seu bom funcionamento, a acetilcolinesterase também é encontrada em outros tecidos, tanto centrais como periféricos (MASSOULIE et al., 1993).

Além da acetilcolinesterase, a butirilcolinesterase, apesar de não com a mesma eficiência, também faz a hidrólise da acetilcolina. Esta enzima é encontrada em maior

quantidade no plasma e o seu principal substrato é a butirilcolina (BuCh), que é hidrolisada mais rapidamente do que a ACh (HUANG et al., 2007).

Assim, quando há inibição das colinesterases, a hidrólise da ACh fica comprometida, fazendo com que os níveis deste neurotransmissor fiquem elevados, e conseqüentemente haja aumento do seu tempo de duração na fenda sináptica. Tal acontecimento pode levar a constante estímulo dos receptores colinérgicos. A inibição destas duas enzimas pode ocorrer de diferentes formas, dependendo do tipo de inibidor que estiver atuando, sendo estes classificados como, (a) inibidores reversíveis, (b) inibidores competitivos, (c) inibidores não competitivos, ou, ainda, (d) inibidores irreversíveis (NORDBERG & SVENSSON, 1998).

Os inibidores de acetilcolinesterase podem ser identificados conforme o tempo de duração da inibição e a sua reversibilidade (FORLENZA, 2005), desta forma, os inibidores irreversíveis levam a modificações químicas que inativam a molécula enzimática enquanto, os inibidores reversíveis podem agir de forma não-competitiva, bloqueando a ligação do substrato através de uma modificação da enzima, para que não ocorra a formação do produto ou ainda, como inibidores competitivos, onde as substâncias de estruturas semelhantes ao substrato formam um complexo com a enzima, deixando o sítio catalítico inativo (MOTTA, 2006).

Os carbamatos são classificados como inibidores reversíveis das colinesterases, em que a diferença na ação dos carbamatos, em relação a outros praguicidas está na estabilidade do complexo de inibição. Tanto a acetilcolinesterase como a butirilcolinesterase, fazem parte do grupo de serina-hidrolases. Quando ocorre a interação destas enzimas com os carbamatos, formam-se resíduos de serina-carbamilada que são menos estáveis e ainda, o radical carbamila formado pode ser quebrado por hidrólise espontânea (ČOLOVIĆ et al., 2013).

A constante de hidrólise, que faz parte da formação da enzima regenerada – AChE(OH), é altamente efetiva, tornando a ação dos carbamatos reversível. Com isso, os carbamatos que se ligaram ao sítio esterásico da enzima de forma covalente, são hidrolisados de forma similar, como acontece na hidrólise da acetilcolina (LARINI, 1997). Portanto, a duração deste efeito deve-se a afinidade relativa de sua ligação com a enzima e, a recuperação da enzima se dá entre 24 e 48 horas, através da hidrólise, que se inicia em questão de minutos ou horas (GOLDFRANK et al, 1994; OLIVEIRA & MENEZES, 2003).

Apesar dos carbamatos se ligarem de forma reversível com as colinesterases, podendo ter a sua ligação revertida em um tempo relativamente curto, esses

compostos podem, ainda, causar graves intoxicações (YANOVSKY et al., 2012). Além de que, condições intrínsecas ao organismo, como situações de estresse, podem facilitar a distribuição dos carbamatos, incluindo a sua passagem para o sistema nervoso central (FRIEDMAN et al., 1996).

De forma geral, os carbamatos não tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica de forma eficaz, resultando como prioridade a inibição da acetilcolinesterase no sistema nervoso periférico. No entanto, a sintomatologia do sistema nervoso central é proveniente de hipóxia (GOLDFRANK et al, 1994; LING et al, 2005; LANNATE, 2015).

Intoxicação por Carbamatos

A intoxicação consiste nos danos causados a partir do contato, inalação ou da ingestão de alguma substância química, que leva a formação de processos patológicos caracterizados por uma série de alterações no sistema fisiológico, estes são evidenciados por uma sintomatologia característica. Os casos de intoxicação aguda estão intimamente relacionados com a dose da substância, e ainda, são influenciados, principalmente, pela tolerância do indivíduo, que em alguns casos podem levar a um fenômeno transitório com recuperação completa, como também, pode apresentar efeitos proporcionalmente graves (WHO, 2015).

Os casos de morte por intoxicações com praguicidas representam aproximadamente um terço dos suicídios em todo o mundo, o que os tornam um problema de saúde e segurança pública. Diante da gravidade do problema, a Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou em 2005, uma estratégia com o objetivo de reduzir a mortalidade, e a morbidade relacionada aos casos de intoxicações com esses tipos de produtos, sendo a abordagem no setor regulatório uma das principais medidas a serem tomadas (WHO, 2004; BERTOLOTE et al., 2006).

Mesmo que a inibição das colinesterases seja de forma reversível, os sintomas que aparecem nos eventos de intoxicação com carbamatos causam grande risco a saúde, uma vez que, a dose letal de 50% (DL50) é elevada. A exemplo do Carbofuran, que também é um inseticida e nematicida da classe dos carbamatos, utilizado em diferentes tipos de lavouras, que apresenta uma DL50 de 5 mg/Kg por via oral, enquanto que pela via dérmica sua DL50 é de 120 mg/Kg. Assim, deve-se considerar

tanto a dose, quanto a via de exposição para a avaliação e o suporte da sintomatologia do caso (ROBERTS & REIGART, 2013).

Independente da via de absorção, o início dos sintomas se dá rapidamente. A gravidade da intoxicação está diretamente relacionada à quantidade de carbamato absorvida pelo organismo (LEIBSON & LIFSHITZ, 2008). A inibição da acetilcolinesterase, além de prejudicial para o sistema nervoso, pode também afetar órgãos periféricos como as vias respiratórias e os pulmões. Os efeitos clínicos estão relacionados com o tipo de receptor, onde ocorre a transmissão de sinais. No caso da superestimulação acontecer nos receptores muscarínicos, os sintomas pertinentes são bradicardia, broncorreia, broncoespasmo, diarreia, hipotensão, lacrimejamento, miose, salivação, micção e vômitos (KING & AARON, 2015).

Quando há superestimulação nicotínica do sistema nervoso central, observa-se agitação, confusão, insuficiência respiratória e coma. (LEIBSON & LIFSHITZ, 2008). No caso de intoxicações agudas, a superestimulação tanto dos receptores nicotínicos, como dos muscarínicos pela acetilcolina, leva a quadros característicos de salivação, lacrimejamento, aumento de secreções salivares e brônquicas, fasciculações, fraqueza muscular, confusão, agitação e coma (EDDLESTON et al., 2008). Os sintomas respiratórios são muito comuns e se iniciam com dispneia, tosse seca, tosse com expectoração e até bronquite crônica, broncoespasmo, dor no peito, dificuldade respiratória, aumento de secreção nasal e irritação na garganta (OHAYO-MITOKO et al., 2000; EDDLESTON et al., 2008).

Presume-se que, o mecanismo responsável seja mediado por alterações respiratórias que ocorrem no sistema nervoso central. Isto, porque há uma forte relação entre a inibição das colinesterases com o aparecimento dos sintomas respiratórios (CHAKRABORTY et al., 2009).

Embora, estruturalmente, os carbamatos sejam incapazes de induzir uma polineuropatia como os organofosforados, há relatos do desenvolvimento da polineuropatia tardia, induzida após intoxicações graves por metilcarbamatos (LOTTI e MORETTO, 2006). Essas complicações neurológicas de caráter intermediário se dão pela habilidade de alguns metilcarbamatos, além de inibir a acetilcolinesterase, inibi outra enzima do mesmo grupo das serina-hidrolases, a esterase envolvida na neuropatia (NTE) (LEIBSON & LIFSHITZ, 2008). Esta neuropatia é caracterizada por fraqueza muscular distal, e geralmente se sucede algumas semanas ou meses após a intoxicação (CASIDA & DURKIN, 2013).

A demência e as disfunções cognitivas podem ser um grande problema de saúde, que influenciam na qualidade de vida dos pacientes que foram afetados por carbamatos. Estudos sugerem uma forte relação entre a exposição a estes praguicidas e ao aumento da prevalência da disfunção cognitiva, além de demência em longo prazo (LIN et al., 2015).

Diagnóstico das Intoxicações por Carbamatos

Apesar dos distúrbios respiratórios não serem exclusivamente observados somente na exposição respiratória (GOSWAMY, CHAUDHURI & MAHASHUR, 1993), quando a exposição se dá por esta via, o pulmão é o primeiro alvo atingido, e os sinais e sintomas progridem rapidamente, de forma que, se não tratado adequadamente em tempo, pode levar à morte (DOWLING & SEIBER, 2002). O comprometimento da função pulmonar pode ser evidenciado pelas alterações dos tecidos, com a presença de hiperplasia epitelial, do espessamento da membrana alvéolo-capilar, e pela degeneração dos alvéolos, além de se observar alterações neuro musculares nos músculos respiratórios (CHAKRABORTY et al., 2009). A perda de consciência associada a hipersecreção podem levar a complicação da sintomatologia, causando pneumonia, o que torna um significativo fator de risco de mortalidade nos pacientes intoxicados (WANG et al. 2010; SUN, YOON & LEE, 2015).

Dados indicam que, embora a sintomatologia seja a mesma, existe diferença na apresentação do quadro clínico entre adultos e crianças. Estas, apontam um fator de predisposição maior que os adultos em apresentar sintomas neurológicos. Nas crianças, também são observados sintomas clássicos de estimulação muscarínica; no entanto, mesmo quando não apresentam estes sintomas, não se exclui as chances de intoxicação (LIFSHITZ, SHAHAK & SOFER, 1999).

De uma forma geral, os episódios das intoxicações agudas por carbamatos tendem a ter menor tempo de duração quando comparados a outros grupos de praguicidas, devido a reversibilidade da inibição das colinesterases (MC DANIEL et al., 2007). Apesar do quadro de uma intoxicação aguda por carbamatos ser característico pelos sintomas relacionados à crise colinérgica, na qual não há a repolarização do neurônio devido a estimulação constante dos receptores de acetilcolina (WESSELING et al., 2002), o diagnóstico pode ser dificultado pela presença de níveis normais das colinesterases sanguíneas, indicando ausência ou não demonstrando a gravidade da intoxicação (ROBERTS & REIGART, 2013).

Além do sistema nervoso, e de existirem também em diferentes órgãos, as colinesterases são encontradas no sangue em duas formas, a acetilcolinesterase e a butirilcolinesterase. Ambas, são consideradas marcadores de efeitos biológicos iniciais, associadas com a exposição à inibidores das colinesterases. Embora sejam semelhantes, suas localizações são diferentes. A acetilcolinesterase verdadeira é encontrada ligada às membranas das células vermelhas do sangue; enquanto a butirilcolinesterase está livre no plasma sanguíneo, o que a favorece no auxílio da atividade da acetilcolinesterase, quando esta se encontra deficiente (POHANKA, 2011).

Porém, há outras limitações para a monitorização adequada das colinesterases do paciente intoxicado, uma vez que, alguns compostos não carbamatos também inibem a butirilcolinesterase. Ainda, os falsos negativos podem interferir quando a amostra é deixada por algum tempo em temperatura ambiente. Embora a butirilcolinesterase seja utilizada como marcador, a mesma não é considerada padrão-ouro, pois nem sempre está relacionada com a gravidade da intoxicação (LEIBSOHN & LIFSHITZ, 2008), enquanto que a acetilcolinesterase é considerada como o melhor marcador, pois a sua inibição ocorre de forma mais eficaz, sendo uma grande ferramenta para o diagnóstico (HOFFMAN et al., 2010).

Além de que, deve ser considerada a possibilidade de efeito rebote da colinesterase. Como já foi identificada em outros estudos, os quais mostraram um aumento apenas na atividade da butirilcolinesterase como um comportamento incomum em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos anticolinesterásicos. Este fato pode ser pertinente ao processo de renovação sanguínea (OLIVEIRA-SILVA et al, 2001; PERES et al, 2005).

Tratamento das Intoxicações por Carbamatos

No tratamento das intoxicações agudas por carbamatos se recomenda a administração de oxigênio, este, é essencial para o suporte da ventilação das vias aéreas (KONICKX, BINGHAM & EDDLESTON, 2014). Ainda, é sugerido procedimentos como, a lavagem gástrica e a administração de carvão ativado, nos casos de ingestão do produto (SUN, YOON & LEE, 2015). Como os carbamatos são inibidores das colinesterases deve-se administrar atropina. Esta, compete com a acetilcolina em se ligar no receptor muscarínico, promovendo ação contrária a superestimulação da acetilcolina. Com isto há um controle da sintomatologia,

principalmente na produção aumentada de secreções salivares, de secreções brônquicas, da broncoconstrição e da bradicardia (VALE & LOTTI, 2015). No entanto, a atividade das colinesterases continua inibida, já que a atropina não tem ação sobre o sítio ativo destas enzimas, mas sim, ação direta nos receptores muscarínicos. A atividade das enzimas só volta ao normal de maneira espontânea (ČOLOVIĆ et al., 2013).

Em conjunto, se faz o tratamento sintomático (SUN, YOON & LEE, 2015). O Aldicarb, como os carbamatos em geral, quando ingeridos, tem 80-90% da dose eliminada através da urina em apenas 24 horas, devido ao seu curto tempo de meia-vida (XAVIER, RIGHI & SPINOSA, 2007). Então, além do cuidado com a permeabilidade das vias aéreas e manutenção das condições respiratórias do paciente, pode-se fazer a correção dos distúrbios hidroeletrólíticos como uma maneira de auxiliar no tratamento, bem como, aliar um aporte calórico apropriado (SCHVARTSMAN, 1991).

Existem reativadores da acetilcolinesterase como as oximas. Estas, são consideradas antídotos para o tratamento das intoxicações por anticolinesterásicos, uma vez que, a sua ação é direta sobre a enzima inibida, reativando-a; com isto, a transmissão colinérgica é retomada (VALE & LOTTI, 2015). Esse tratamento, em conjunto com a atropina, é utilizado como padrão em eventos de intoxicação por organofosforados, que tornam as colinesterases fosforiladas (KING & AARON, 2015). Nas intoxicações por carbamatos, o tratamento com oximas não é recomendado, pois as oximas não atuam na colinesterase carbamilada (PARANÁ, 2014) e ainda, alguns estudos mostram que as oximas aumentam a toxicidade dos carbamatos reduzindo a eficácia terapêutica (WILLE et al., 2013).

Além da atropina existem também, medicamentos que atuam direta e indiretamente nos receptores muscarínicos e nicotínicos, estimulando ou inibindo o sistema colinérgico (BRUNTON, CHABNER & KNOLLMANN, 2012). Entretanto, até o momento não se tem conhecimento de nenhuma substância com capacidade de reverter diretamente a enzima carbamilada, assim, como as oximas atuam especificamente na colinesterase fosforilada (XAVIER, RIGHI & SPINOSA, 2007). Esta área ainda se encontra carente em relação a uma terapia com ação mais específica. A descoberta de novos compostos, ou o uso de produtos naturais que atuem sobre o sistema colinérgico podem ser uma alternativa para o tratamento desses casos (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

***Melia azedarach* L.**

Nos últimos anos, a população brasileira se vale cada vez mais do uso de plantas medicinais e fitoterápicos em seus tratamentos. Num levantamento feito entre os anos de 2013 e 2015, a busca por produtos naturais no Sistema Único de Saúde (SUS), cresceu 161%, chegando a quase 16 mil pessoas que recebem esses produtos (PARANÁ, 2016).

O uso de terapias à base de produtos naturais para a prevenção ou para o tratamento de doenças têm introduzido estes produtos na pesquisa científica, devido ao fácil acesso e a crença de eventual diminuição dos efeitos colaterais. Diversas são as origens que apresentam propriedades farmacologicamente ativas, sendo as plantas, parte dessa imensa fonte de recursos naturais (ALZOHAIRY, 2016).

A família Meliaceae, muito estudada, compreende aproximadamente em 51 gêneros divididos em quatro sub-famílias: Melioideae, Swietenioideae, Quivisianthoideae e Capuronianthoideae. Estas, são distribuídas pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas quente. Os gêneros *Melia* e *Azadirachta* são os representantes dessa família na flora brasileira e se destacam por apresentarem abundância em metabólitos secundários responsáveis por compostos biologicamente ativos, com ações de interesse farmacológico (PENNINGTON & STYLES, 1975).

O gênero *Melia* apresenta 5 espécies, as quais são utilizadas praticamente todas as suas partes, como medicamentos à base de plantas para o tratamento de diversas doenças, devido a produção de uma grande quantidade de compostos. Além disso, esse gênero é comum por dispor de uma fonte repleta de limonoides bioativos, comumente utilizados como inseticidas (ZHAO et al, 2010).

Um pertinente membro da família Meliaceae é a *Melia azedarach* (Figura 4), nomeada por Linnaeus, e popularmente conhecida como cedro branco, lilás persa e cinamomo. É nativa do Nordeste da Índia, mas sendo também cultivada em diversos países da Ásia, América do Norte e América Latina. Em virtude de ser originária da Ásia tropical, apresenta ampla disseminação e naturalização na maioria dos trópicos e países subtropicais, como o Brasil (DELLA BONA & NEDEL, 2014).

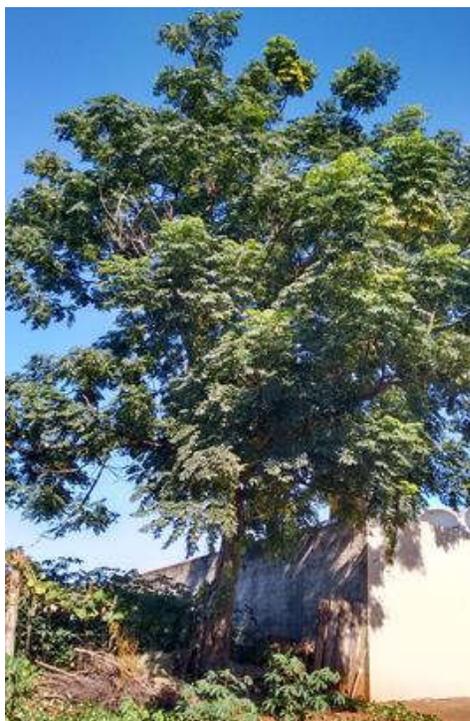


Figura 4 Espécie vegetal *Melia azedarach* L.

Foto: Fabiana Sari Ferreira

O cultivo desta planta existe desde muitos anos, e esta espécie cresce rapidamente, seja o plantio feito por semente ou estaca. Considerada ornamental pode atingir aproximadamente de 15 a 20 metros de altura. Possui tronco marrom-avermelhado ou pardo-acinzentado. Suas folhas glabras são alternadas, longopeciouladas, bipinadas, glabras, com folíolos lanceolados e agudos. As flores são pequenas e numerosas, perfumadas, se apresentam em panículas eretas e multiflorais, com coloração lilás e anteras amareladas. Seus frutos são ovoides do tipo dupra, pouco carnoso e de coloração marrom-amarelada (DE ARAUJO et al,2009; LORENZI & MATOS, 2003).

Tanto na medicina popular, quanto na medicina tradicional, em vários países, diferentes tipos de extratos desta planta têm sido utilizados, seja por via oral ou tópica, para o tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas, como agente antiviral, diurético, antipirético e contra desordens intestinais (SAMUDRAM et al., 2008). Graças a variedade na sua composição química, cientificamente diversas atividades biológicas têm sido pesquisadas, como antioxidantes, antimicrobianas, antiprotozoárias, antinematoides, anti-inflamatória, antipirética e antiulcerativa (RUTKAUSKIS et al., 2015). Nas folhas, ramos e frutos desta espécie, foram encontrados vários compostos, principalmente a presença de limonoides, além de taninos, alcaloides e flavonoides (JORGE et al., 2009).

Principais compostos de *Melia azedarach* L.e suas propriedades

De modo geral, os vegetais da família Meliaceae sintetizam alguns metabólitos secundários em comum, mas a abundância de limonoides faz com que estes se destaquem, apresentando atividades biológicas diversas como antiprotozoária, inseticida e citotóxica (FANG, DI & HAO, 2011).

A azadiractina (Figura 5), é um exemplo de limonoide encontrado somente em três espécies do gênero da família Meliaceae; a *Azadirachta indica* A. Juss, a *Melia toosedan* Siebold & Zucc e a *M. azedarach*. Estes compostos presentes nas folhas e nos frutos da *M. azedarach* têm provocado interesse para novas pesquisas, devido a sua atividade inseticida. Através da ação inibidora da alimentação o que a torna intensamente tóxica para os insetos (CARPINELLA et al., 2002).

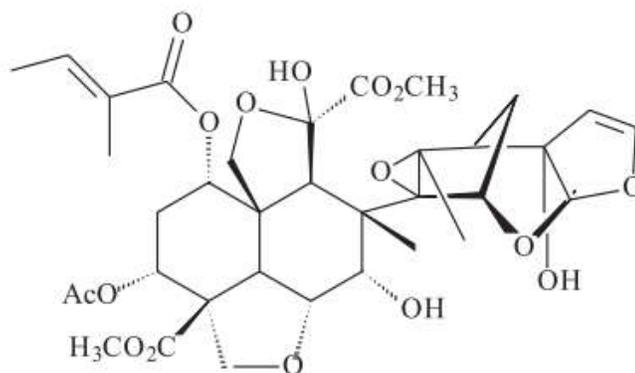


Figura 5 Estrutura química da azadiractina

Fonte: ALMEIDA et al., 2007.

Os limonoides fazem parte do grande grupo dos terpenoides, que formam uma diversificada classe de substâncias. Estes, formam um grande grupo de compostos naturais, com estruturas derivadas de uma ou várias unidades isoprênicas (C₅)_n, que são precursores dos demais compostos (DEWICK, 2002). Os limonoides, conferem sabores melhores aos produtos cítricos após o processamento, além de exibirem atividades biológicas que são importantes no uso da medicina tradicional, assim como, em modernos nutracêuticos (GUALDANI et al, 2016). Compostos como os triterpenoides isolados apresentam propriedades farmacológicas bem conhecidas, atuando como analgésico e apresentando atividade anticancerígena, antiviral, antibactericida e antimalárica (TAN et al., 2010).

Vários tipos de terpenoides foram avaliados em relação a sua toxicidade aos insetos, mostrando forte característica nos compostos que apresentam a maior sequência de produção de terpenos, mas não deixando de expressar esta

característica nos compostos com cadeia menor. Assim, as plantas que regularmente não são atacadas por insetos, geralmente são constituídas por tetranortriterpenoides, como são chamados os limonoides (VIEGAS JÚNIOR, 2003; ZHOU et al., 2005)

Da classe dos compostos fenólicos, os flavonoides se destacam por apresentar estrutura química e características diferenciadas. Sua estrutura é baseada num esqueleto com dois anéis benzênicos (A e B), ligados a um anel pirano (C), acoplado no anel A, conforme Figura 6 (BEHLING et al., 2004). Podem ser divididos de acordo com a sua estrutura, se ligando ou não com unidades de açúcar à sua molécula, chamados de glicosídeo ou aglicona, respectivamente (DEWICK, 2002).

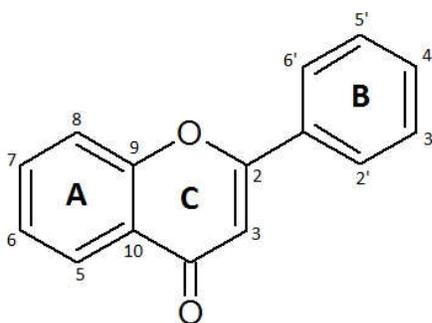


Figura 6 Estrutura química básica dos flavonoides.

Fonte: Adaptado de BEHLING, et al. 2004.

Os flavonoides, são comumente encontrados em diversos produtos naturais, protegendo esses organismos, principalmente, dos agentes oxidantes, desta forma, são apontados como um dos maiores grupos de metabólitos secundários. Encontrados com frequência na alimentação humana, como em frutas, folhas, chás, vinhos e outros alimentos, logo, são considerados protetores naturais do organismo, frente a diversos efeitos adversos (DA SILVA et al 2015).

A quercetina, é um flavonoide muito conhecido por ser encontrado na natureza de forma acessível (ORFALI et al., 2016). Esta, se diferencia dos demais flavonoides por apresentar radicais hidroxilas como substituintes nas posições 3, 4, 5 e 7, da estrutura básica dos flavonoides. Isso faz com que seja atribuída atividade antioxidante a estes compostos, principalmente por serem agliconas com hidroxilas ligadas em C3 e C4 (DORNAS et al., 2007). Pesquisadores encontraram compostos flavonoides, dentre eles as quercetinas, em extrato de folhas de *M. azedarach*. Estes foram isolados e identificados frente a diversas atividades como antioxidante, inibidora da angiogênese, inseticida e outras (RUTKAUSKIS et al., 2015; KUMAZAWA et al., 2013; ZHOU et al., 2005).

Outra classe de compostos encontrados na *M. azedarach* são os alcaloides de caráter básico e nitrogenados. Os alcaloides, comumente encontrados na família Meliaceae são os quinazolônicos, diterpênicos ou mistos. Apresentam amplo espectro das atividades biológicas que pode ser em consequência da sua variedade natural (DE ARAÚJO et al., 2009). Farmacologicamente ativos, oferecem atividade anti-helmíntica (CALA et al., 2012), antifúngica (XIAO et al., 2014) e antipirética pela inibição da síntese de prostaglandinas E2 (SULTANA, AKHTAR & ASIF, 2013). E ainda, um alcaloide que vem sendo estudado devido as suas propriedades físicas e químicas é a azaridina, encontrada nos frutos da *M. azedarach* e, se mostra com um possível poder antitumoral (ISMAIL, LEVITSKY & DEMBITSKY, 2009).

Já os compostos responsáveis pela adstringência de muitos frutos e plantas são os taninos, por causa da precipitação de glucoproteínas salivares que leva a perda do poder lubrificante da saliva (MONTEIRO et al., 2015). Resultantes do metabolismo secundário da *M. azedarach*, estes são compostos polifenólicos que se complexam facilmente com proteínas e, desta forma, podem atuar como inibidores enzimáticos de forma significativa, o que lhes confere propriedades bactericida e antimicrobiana de forma geral na defesa da planta (GEMEDA & HASSEN, 2015).

Os taninos são muito reativos quimicamente por se tratarem de compostos fenólicos, formando pontes de hidrogênio intra e intermoleculares. Também são facilmente oxidáveis, tanto através de reação enzimática, quanto por influência de metais, e ainda, são classificados como hidrolisáveis, ou condensados de acordo com a sua estrutura (MONTEIRO et al., 2005). A grande quantidade de taninos presente em algumas plantas, faz com que estas sejam empregadas na medicina tradicional para o tratamento de várias doenças. Pelos taninos se ligarem às proteínas, atuam como antisséptico em lesões, queimaduras e inflamações. É também usado em casos de diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, problemas gástricos, problemas renais e do sistema urinário (PANSERA et al., 2003).

Toxicidade da *Melia azedarach* L.

De acordo com o Ministério da Saúde (2006), apesar da medicina moderna estar bem desenvolvida na grande maioria do mundo, muitas drogas de origem vegetal são consideradas básicas e essenciais, pois aproximadamente 85% da população, principalmente dos países em desenvolvimento, faz uso significativo de plantas medicinais, ou preparações destas para a sua atenção primária.

As pesquisas envolvendo a *M. azedarach* para o tratamento de diversas doenças tem sido progressiva, pois na medicina tradicional esta planta é muito utilizada. Porém, apesar de amplamente abordada em relatos da literatura veterinária, a toxicidade desta planta para o organismo humano não tem sido relatada com frequência (DE ARAÚJO, 2009).

Seu nome deriva de palavras gregas que significam florações cinzas para *Melia*, e *azedarach* é proveniente do nome de uma antiga árvore venenosa chamada de *Azadaracht*, atualmente desconhecida. No homem, os casos de intoxicação acidental se referem a ingestão de folhas, principalmente, da casca da planta na forma de chás para ter efeito diurético, ou para o tratamento do alcoolismo, como antiparasitário, antifúngico analgésico, anti-inflamatório, antidiabético e outras enfermidades (SHARMA & PAUL, 2013).

Alguns casos relatam a toxicidade, mostrando que toda a planta pode ser tóxica. Foram observados sintomas neurológicos, como fraqueza, dor muscular, mialgia, dormência e ptose unilateral; além de sintomas como, vertigem, visão turva, náuseas, salivação, diarreia e alteração da temperatura corporal. Em todos os casos houve aumento das transaminases e creatinofosfoquinase, enquanto que o hemograma e a função renal se apresentaram normais (PHUA et al., 2008).

Já os animais geralmente são intoxicados de forma acidental, por ingerirem folhas, flores e frutos caídos, sendo os suínos os mais afetados com os efeitos tóxicos dos frutos maduros. Experimentos *in vivo* em cães, gatos, ratos e porcos, mostraram o aparecimento de sinais e evolução clínica dentro de poucas horas, com prevalência de alterações neurológicas e gastrintestinais, independente do animal. Foram observadas também, lesões intensas no fígado, rins, tecido linfático e musculo esquelético, danos estes, que podem até levar à morte (MÉNDEZ et al., 2002; MÉNDEZ et al., 2006).

Todos os prejuízos em consequência do uso da *M. azedarach* são decorrentes dos componentes tóxicos que a planta apresenta. Estes compostos são tetranortriterpenoides conhecidos como meliatoxinas A1, A2, B1, e B2, conferindo toxicidade a toda planta, entretanto, com maior concentração nos frutos (CORTINOVIS & CALONI, 2013). Além disso, vários compostos foram identificados nesta planta, os quais têm ação sobre o sistema fisiológico e também, alguns estudos mostraram que os compostos desta planta têm efeito inibitório sobre as colinesterases de muitas espécies, incluindo o homem (MAREK et al., 2012).

Efeito de *Melia azedarach*L. sobre as colinesterases

Pesquisas estão sendo realizadas em busca de estratégias para o tratamento de doenças neurodegenerativas, através do uso de inibidores das colinesterases. Assim, testes com várias plantas medicinais tradicionais são realizados para mostrar a possível ação das mesmas no sistema colinérgico (VINUTHA et al., 2006).

Breuer et al. (2003), avaliou possíveis eventos neurotóxicos provenientes da *M. azedarach*, onde foi feita, a medida da atividade enzimática das colinesterases em homogenatos de larvas após a adição do extrato da planta. A adição do extrato resultou em uma inibição significativa quando comparada com o grupo controle, o que pode confirmar achados de estudos anteriores que afirmavam a inativação do neurotransmissor de acetilcolina. Porém, esta ação não acontece de forma tão simples, pois é provável que não exista apenas um único composto ativo na planta responsável por sua ação, mas sim, vários componentes estarão envolvidos.

Ainda, foram evidenciadas atividades inibitórias da butirilcolinesterase em homogenatos de fígado de ratos, utilizando diferentes tipos de extratos de *M. azedarach*. Devido a este efeito inibitório mostrou ser independente do tipo de extrato, podendo ser efeito da presença de diferentes compostos. Entretanto, um possível efeito dos flavonoides foi considerado pelas características desses compostos em interagir com diversas proteínas. Contudo, o mecanismo pelo qual se dá este efeito ainda não foi esclarecido (MAREK et al., 2012).

Estudos mostraram também, a inibição significativa das colinesterases, em coelhos alimentados com frutos de *M. azedarach* L (AL-KHAFAJI & AL-FARWACHI, 2000). E, outras pesquisas feitas com extrato de folhas desta planta, novamente a inibição das colinesterases foi observada, e ainda, foi constatado que nem sempre a *M. azedarach* atua inibindo o sistema colinérgico, da mesma forma dose-dependente como outras plantas, sendo necessários mais estudos que ajudem a evidenciar estes efeitos sobre o sistema colinérgico (BULLANGPOTI et al., 2012).

4. CAPÍTULO: ARTIGO ORIGINAL

Efeito do extrato de *Melia azedarach* L. sobre a atividade das colinesterases em ratos envenenados com metilcarbamato

Efeito do extrato de *Melia azedarach* L. sobre a atividade das colinesterases em ratos envenenados com metilcarbamato

Fabiana Sari Ferreira¹, Carla Brugin Marek^{1*}, Ana Maria Itinose², Sara Cristina Sagae³, Fernanda Coleraus Silva¹

¹Laboratório de Toxicologia Celular, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária 1619, 85819110, Cascavel, Brasil

²Centro de Assistência em Toxicologia (CEATOX), Hospital Universitário do Oeste do Paraná, Avenida Tancredo Neves 3224, 85806470, Cascavel, Brasil

³Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária 1619, 85819110, Cascavel, Brasil

sari.fabiana@gmail.com, itinoseanamaria@uol.com.br, sarasagae@gmail.com, fercoleraus@gmail.com

***Autor correspondente:** Carla Brugin Marek, Laboratório de Toxicologia Celular, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária 1619, 85819110, Cascavel, Brasil. Tel/Fax +55 45 3321-5429; E-mail: carla.marek@unioeste.br.

Efeito do extrato de *Melia azedarach* L. sobre a atividade das colinesterases em ratos envenenados com metilcarbamato

Resumo

Os carbamatos são produtos fundamentais para a formulação de praguicidas. Embora sua produção e a comercialização sejam com a finalidade de eliminação de insetos, a sua utilização em tentativas de suicídio é comum em nosso meio, além das intoxicações acidentais envolvendo trabalhadores rurais e crianças, devido sua propriedade toxicológica em inibir as enzimas acetilcolinesterase e butirilcolinesterase. A atividade destas enzimas só volta ao normal espontaneamente, assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a possível ação do extrato de folhas de *Melia azedarach* L. sobre o sistema colinérgico inibido por metilcarbamato. Foram testadas *in vitro* e *in vivo*, diferentes concentrações de extrato tamponado de *Melia azedarach* L., quanto a atividade da acetilcolinesterase inibida por metilcarbamato. Os resultados mostraram que o extrato de *Melia azedarach* L. tem potencial efeito de reversão sobre a enzima inibida pelo metilcarbamato, se tornando uma alternativa na terapia do tratamento de intoxicações com carbamatos.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase, agrotóxico, flavonoides

The effect of extract of *Melia azedarach* L. On cholinergic system of rats poisoned with methyl carbamate

Abstract

Carbamates are essential products for pesticide formulation, mainly used in agriculture for the elimination of insects. Although the production and trade of carbamates are for purpose insects elimination, it is common used to suicide attempts in our environment, in addition to accidental poisonings involving rural workers and children. The toxicological property is inhibit the acetylcholinesterase and buthyrylcholinesterase enzymes which leads a severe poisoning related to cholinergic crisis. The enzymes activity get back to normal only spontaneously, so the study of new substances that can intervene directly on the active site of these enzymes when it is inhibited and reverse this toxic action is necessity for the health. Researchs with *Melia azedarach* L. (Meliaceae) has been made searching for new strategies for treatment of enzyme inhibity by methyl carbamate poisoning. Different concentrations of *Melia azedarach* L. buffered extract were tested *in vitro* and *in vivo* for acetylcholinesterase activity inhibited by methylcarbamate. The results showed that the extract of *Melia azedarach* L. has a potential reversion effect on the enzyme inhibited by methyl carbamate, becoming an alternative to treatment of carbamate intoxication

Key-words: Acetylcholinesterase, pesticides, flavonoid

1. Introdução

Os casos de envenenamentos com praguicidas representam aproximadamente um terço dos suicídios em todo o mundo, o que os tornam um problema de saúde e segurança pública [1]. O metil carbamato é um metil éster derivado do ácido carbâmico, inseticida comumente utilizado em casas, jardins e na agricultura [2]. Seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da acetilcolinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) e da butirilcolinesterase (BuChE; EC 3.1.1.8), no inseto; entretanto este mecanismo de ação não é seletivo para os insetos, podendo atuar da mesma forma sobre as colinesterases dos animais, incluindo dos humanos [3, 4]. Esta inibição leva ao acúmulo de acetilcolina, tendo como consequência a crise colinérgica, quadro característico do envenenamento, pela constante estimulação dos receptores colinérgicos[5].

O suporte clínico com a administração de atropina, antagonista competitivo da acetilcolina nos receptores muscarínicos, não leva a reversão das colinesterases, já que a atropina tem ação direta sobre os receptores muscarínicos[6]. A atividade das enzimas só retorna ao normal de forma espontânea, pois não há um reativador específico para a acetil- ou butirilcolinesterase.

Neste contexto, a pesquisa de substâncias para terapia complementar no tratamento destes envenenamentos é relevante, e as plantas medicinais têm se destacado como uma rica fonte de compostos farmacologicamente ativos. *Melia azedarach* L. (Meliaceae), é uma planta comumente conhecida como cedro branco, lilás persa, cinamomo ou santa bárbara. É uma árvore nativa da China, Índia e Pérsia, e amplamente distribuída em todo o mundo, especialmente nos trópicos, devido a sua tolerância climática [7]. Extratos e decoctos de suas folhas, raízes e caule, têm sido usados oral e topicamente pela medicina tradicional para o tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas, como agente antiviral, diurético, antipirético, antiproliferativo e contra desordens intestinais [8]. Um grande número de flavonoides, limonoides, taninos, esteroides, saponinas e triterpenoides foram identificados nesta planta [9, 10]. No homem, estes compostos agem sobre importantes reações metabólicas e sistemas enzimáticos, incluindo a acetil- e butirilcolinesterase [11, 12].

Apesar de seu uso, tanto na medicina tradicional, como popular; até o momento nenhum estudo foi realizado para verificar a sua ação sobre envenenamentos. Assim, o presente trabalho foi conduzido para verificar a possível ação do extrato de folhas de *M. azedarach* sobre o sistema colinérgico, inibido por metilcarbamato, uma vez que

estudos iniciados em nosso laboratório, com o extrato de *M. azedarach* mostrou ativar a atividade das colinesterases de ratos saudáveis (dados não publicados). Por isso, um extrato aquoso tamponado foi selecionado para este estudo, e o seu efeito sobre a acetil- e butirilcolinesterase foi examinado *in vitro* e *in vivo*, com ratos envenenados com metilcarbamato. Particularmente, observou-se a potencialidade em se obter uma nova alternativa como terapia complementar no tratamento dos envenenamentos por metilcarbamato.

2. Materiais e Métodos

2.1 Caracterização do extrato e efeitos da *M. azedarach*

Folhas verdes de *M. azedarach* foram coletadas de árvores cultivadas no município de Cascavel, Paraná, Brasil (Latitude 24°57'21" e Longitude 53°27'19"), em março de 2015. O espécime foi identificado pela bióloga Dr^a. Norma Catarina Bueno, por comparação com voucher N° 4703, depositado no herbário do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. As folhas foram lavadas com água destilada e colocadas para secar em estufa em temperatura de 40°C. Após a completa secagem das folhas, estas foram trituradas até a obtenção de um pó. O extrato foi preparado a partir deste pó em uma concentração de 30% (m/v) em meio tamponado (pH 7,2), conforme Alché et al [7]. A extração foi feita com um misturador comercial, utilizando tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,2) contendo 350 mM de cloreto de potássio (KCl). A mistura resultante foi filtrada e centrifugada a 5.000 g durante 1 hora. O *pellet* foi descartado e o sobrenadante liofilizado. Este liofilizado foi solubilizado em água destilada, e mantido *overnight* sob agitação. Em seguida, foi centrifugado novamente a 5.000 g durante 1 hora, o *pellet* descartado e o sobrenadante liofilizado. A partir desta segunda liofilização o extrato estava pronto para o estudo. A caracterização do extrato foi feita através de triagem fitoquímica, do espectro de absorção no UV, e do espectro de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H).

Triagem fitoquímica: Para esta análise, o extrato foi fracionado por partição líquido-líquido, com solventes com aumento de polaridade, na sequência com diclorometano, acetato de etila e n-butanol. Em seguida, o extrato bruto e as frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada, usando sílica gel F254 (Merck, Darmstadt, Germany) como adsorvente. Duas fases móveis foram empregadas: acetato de etila: ácido fórmico: água (8:1:1 v/v/v), e tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (5:5:0,5 v/v/v). O cromatograma foi analisado em luz UV 254 e 365 nm. As manchas foram recortadas da cromatoplaça e solubilizadas em água destilada, a classe dos compostos foi investigada com reações específicas. A saber, a presença de alcaloides foi pesquisada por meio do reagente de Dragendorff's e Mayer [13], a reação de Liebermann-Burchard foi usada para investigar a presença de esteroides [14], os taninos foram pesquisados por meio de sais de ferro [15], para flavonoides empregou-

se a reação de Shinoda's [16]e, para saponinas e cumarinas, utilizou-se metodologia descrita por Barbosa-Filho et al.[17]. Uma parte do extrato bruto foi reservada para análise no espectro UV.

Espectro de absorção no UV: Foram preparadas soluções aquosas com concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 mg.L⁻¹ do extrato. Os espectros foram obtidos nos comprimentos de onda entre 200 e 400 nm, com uma resolução de 2 nm, em espectrofotômetro BIOSPECTRO SP-220, com mínima adaptação de Marek et al.[18].

Espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ¹H): Foram obtidos os espectros de RMN de ¹H em espectrofotômetro BRUKER (500 MHz), do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Foram utilizados solventes deuterados D₂O, CD₃OD e CDCl₃ (Tedia), conforme Rutkauskis et al[10].

Teste de hemólise. O teste de hemólise para o extrato de *M. azedarach* foi realizado conforme descrito por Latoud et al.[19]. Para o teste, 500 µL de suspensão de eritrócitos a 4% foram incubados a 37°C por 60 minutos com 500 µL do extrato em diferentes concentrações (0,25 – 4,00 mg.mL⁻¹). Após a incubação a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 400 g e o sobrenadante coletado e lido em 450 nm. Como controle negativo utilizou-se tampão PBS e como positivo ácido acético a 2% (100% de hemólise). O resultado foi expresso em porcentagem de hemólise.

Citotoxicidade com Artemia salina. O ensaio foi realizado conforme Meyer et al[20]. Para o teste, foram utilizados de 20 a 30 exemplares viáveis da fase larval (náuplios) do microcrustáceo *Artemia salina*. Foram adicionados 10 µL do extrato de *M. azedarach* nas concentrações de 0,50, 1,00, 2,00 e 4,00 mg.mL⁻¹. Após 24 horas de exposição ao extrato, foram contados os náuplios sobreviventes. Foi utilizado como controle negativo, solução salina e, hidróxido de sódio a 1% como controle positivo. Os resultados foram expressos como porcentagem de mortalidade. O teste foi considerado efetivo quando a mortalidade do controle negativo foi inferior a 50% e do controle positivo superior a 80%.

2.3 Análise da atividade da Acetilcolinesterase *in vitro*

Para os ensaios foram utilizados homogenatos de cérebro de rato como fonte da enzima e as determinações enzimáticas seguiram metodologia descrita por Ellman et al.[21].

Atividade enzimática da acetilcolinesterase com a adição do extrato de M. azedarach:

A curva foi realizada incubando o extrato de *M. azedarach* nas concentrações finais de 0,25; 0,50; 1,0; 1,5 e 2,0 mg.mL⁻¹. Para o ensaio utilizou-se tampão fosfato 104 mM (pH 8,0) e 10 mM de ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA). A quantidade de homogenato adicionada à reação foi o equivalente a 0,25 mg de proteínas e esta mistura foi incubada durante 150 segundos a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de 50 mM de iodeto de acetilcolina (ACh, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, EUA). A mudança da atividade enzimática foi registrada a 405 nm durante 60 segundos e os resultados expressos em nmol de substrato hidrolisado por minuto por miligrama de proteína.

Atividade enzimática da acetilcolinesterase após a adição de metilcarbamato: A atividade foi medida em diferentes tempos de incubação (5:00; 7:30; 12:30; 22:30; 32:30; 42:30; 52:30 e 62:30 minutos), entre os homogenatos e 45 mM de metilcarbamato. A concentração do metilcarbamato foi escolhida conforme estudos realizados anteriormente (dados não publicados).

Atividade enzimática da acetilcolinesterase após a adição de extrato de M. azedarach em homogenatos tratados com metilcarbamato: Os ensaios foram realizados adicionando-se o extrato nas concentrações finais de 1 e 2 mg.mL⁻¹, após a adição de metilcarbamato, com incubações de 2:30; 5:00; 12:30 e 32:30 minutos.

2.3 Estudos *in vivo*

Desenvolvimento de um modelo experimental de ratos envenenados com metilcarbamato. Foram utilizados ratos machos e fêmeas, albinos da linhagem Wistar, adultos, pesando entre 200 e 250 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno e em ambiente com ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura controlada de 22°C (±

2°C), sistema de exaustão, alimentados *ad libitum* com dieta padrão de laboratório (Algomix®) e água potável. Todos os procedimentos experimentais seguiram o protocolo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA/UNIOESTE).

Antes de iniciar os experimentos, os animais foram ambientalizados e observados diariamente durante uma semana. Após este período de adaptação, os animais que não apresentaram nenhum comportamento anormal ou algum tipo de sintomatologia foram divididos aleatoriamente em 6 grupos experimentais, com 4 a 6 animais em cada grupo. Todos os ratos tratados receberam dose única de metilcarbamato e foram observados diariamente durante 15 dias. O metilcarbamato foi solubilizado em água e administrado por via oral nas doses de 5.000 e 8.000 mg.Kg⁻¹ de peso para os ratos machos, e nas doses de 2.500 e 5.000 mg.Kg⁻¹ de peso para as fêmeas. Os respectivos grupos controle receberam água por via oral. As doses utilizadas de metilcarbamato seguiram o disposto pelo National Toxicology Program (NTP) [22]. Os grupos foram divididos conforme abaixo:

Grupo Machos – Grupo controle, onde foi administrado água.

MC8: Foi administrado metilcarbamato 8.000 mg.Kg⁻¹ de peso.

MC5: Foi administrado metilcarbamato 5.000 mg.Kg⁻¹ de peso.

Grupo Fêmeas – Grupo controle, onde foi administrado água.

MC5: Foi administrado metilcarbamato 5.000 mg.Kg⁻¹ de peso.

MC2.5: Foi administrado metilcarbamato 2.500 mg.Kg⁻¹ de peso.

Durante todo o período experimental, os animais receberam água e alimento à vontade. Todos os animais foram observados durante todo o período experimental, em relação a morbidade ou mortalidade, além da sintomatologia clínica relacionada à intoxicação[23]. Para a sintomatologia clínica adotou-se um critério de pontuação em relação à intensidade dos sintomas observados, assim: 1 – sem sintomatologia; 2 – fraca sintomatologia; 3 – moderada sintomatologia e 4 – severa sintomatologia. No primeiro dia, foram observados imediatamente após o tratamento e a cada 30 minutos durante as 8 primeiras horas. No restante do período experimental, foram observados quatro vezes ao dia. No último dia, os animais que sobreviveram foram eutanasiados com overdose de cloridrato de quetamina (Ketamin: Cristália, Brasil), e cloridrato de xilazina (Anasedan: Vetbrands, Brasil) por via intraperitoneal. O protocolo experimental

segiu os modelos de estudo de toxicidade conforme Quest et al. [24], o National Toxicology Program [22] e Prado-Ochoa et al. [25].

Estudo do efeito do extrato de M. azedarach sobre a atividade da acetil- e butirilcolinesterase em ratos envenenados com metilcarbamato: Foram utilizados 36 ratos machos, distribuídos aleatoriamente em 6 grupos experimentais (controle, metilcarbamato 40 mg.Kg⁻¹ de peso animal, metilcarbamato 40 mg.Kg⁻¹+ extrato *M. azedarach* 125 mg.Kg⁻¹, extrato *M. azedarach* 125 mg.Kg⁻¹, metilcarbamato 40 mg.Kg⁻¹+ extrato *M. azedarach* 250 mg.Kg⁻¹, extrato *M. azedarach* 250 mg.Kg⁻¹), contendo 6 animais cada, e submetidos a canulação da veia jugular, conforme Harms & Ojeda[26], com pequenas adaptações. Os animais ficaram em jejum *overnight* e sob anestesia com cloridrato de quetamina (100 mg.Kg⁻¹ de peso animal) e cloridrato de xilazina (15 mg.Kg⁻¹ de peso animal), tiveram os pelos da área do pescoço removidos e a área cirúrgica limpa com álcool 70%. Foi feita uma incisão de aproximadamente 0,5 cm na pele, próximo a escapula, usando tesoura cirúrgica. Com o auxílio de uma pinça, sem corte, os tecidos foram dissecados até o encontro da artéria jugular para melhor visualização. Um cateter intravenoso (Abocath 24G), foi inserido na veia jugular e mantido heparinizado. Através deste,foi realizada a coleta de sangue para as determinações enzimáticas e, também, administrado metilcarbamato e o extrato de *M. azedarach*. O sangue foi coletado nos tempos 0, 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos, e o volume retirado (0,4 mL), foi imediatamente repostado com solução salina 0,9%. O metilcarbamato e o extrato de *M. Azedarach* foram administrados uma única vez, nos tempos “0” e 5 minutos, respectivamente. O grupo controle recebeu apenas solução salina 0,9% no tempo “0” da mesma forma que os grupos que receberam apenas extrato de *M. azedarach*. As doses de metilcarbamato e do extrato de *M. azedarach* foram baseadas em experimentos anteriores. Tanto o metilcarbamato quanto o extrato foram solubilizados em solução salina 0,9%. Todos os animais foram mantidos sob anestesia durante todo o procedimento experimental. Ao final do experimento todos os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico, o cérebro e fígado retirados para a determinação da atividade da acetil- e butirilcolinesterase, respectivamente [27].

Determinação da atividade da acetil- e butirilcolinesterase no sangue: Para a determinação da atividade da acetilcolinesterase foi preparado um hemolisado a partir de 0,2 mL de sangue lavado com tampão fosfato (pH 7,2). Em meio tamponado e com

0,05 mM de DTNB, foi adicionado 2,5 μ L de hemolisado e 50 μ L de substrato de iodeto de acetilcolina. A leitura da absorbância foi realizada em 405 nm a 37 °C a cada 30 segundos, durante dois minutos. Para a determinação da atividade da butirilcolinesterase plasmática foi incubado a 25 °C por 3 minutos, em meio tamponado e com DTNB, 10 μ L de plasma. Após este tempo, adicionou-se 3 μ L do substrato iodeto de butiriltocolina e mantido incubado por mais 2 minutos. Em seguida, leu-se em 405 nm a 25 °C a cada 30 segundos, durante 1:30 minuto. Os resultados foram expressos em μ Kat.L⁻¹, onde Kat define a quantidade do catalisador, correspondendo aos moles reagidos por segundo; assim, 1 Kat= mol.s⁻¹.

Preparo dos homogenatos de cérebro e de fígado de rato: Os homogenatos foram preparados conforme adaptação da metodologia descrita por Cimasoni[28]. Após a retirada dos cérebros, estes foram pesados e cortados em pequenas frações. Os fragmentos foram homogeneizados com solução de Ringer com Triton X-100 (0,5%) por meio de homogeneizador de Dounce em banho de gelo. Em seguida, os homogenatos foram submetidos a centrifugação diferencial, a 536 g durante 10 min e 4000 g por 10 minutos. A fração sobrenadante foi utilizada como fonte da enzima acetilcolinesterase. O mesmo foi feito com o fígado, utilizando para este, apenas Ringer com Tampão fosfato pH 7,2 (5:1). A dosagem de proteína dos homogenatos foi realizada pelo método de Lowry et al.[29], utilizando o reagente de Folin e a albumina bovina, 20% como padrão.

2.6 Análise estatística.As análises estatísticas foram realizadas pelo *software* GraphPad Prism 5.03. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). Foi realizado o test t e aceito como estatisticamente significativo quando $P < 0.05$. Para os testes de hemólise e os bioensaios os resultados foram expressos em porcentagem.

3. Resultados

3.1 Caracterização do extrato.

A análise fitoquímica do cromatograma com reagentes específicos sugere a presença de alcaloides, cumarinas, flavonoides, taninos e triterpenóides nos *spots*. No espectro de absorção do UV (Fig. 1), o extrato bruto de *M. azedarach* mostrou máximo de absorção na faixa gama do ultravioleta. Foi encontrado um pico entre 260 e 275 nm com a formação de uma ligeira proeminência na região próxima ao visível, entre 325 e 350 nm, sugerindo pela literatura a presença de compostos flavônicos[30]. Já os espectros de RMN de ^1H mostram sinais principalmente em 3.2-4.8 ppm, característicos de hidrogênios de carbonos ligados a elementos eletronegativos e, picos presentes em < 2.7 ppm que são característicos de moléculas alifáticas. Há também a presença de pequenos sinais na faixa dos compostos aromáticos (Fig. 2).

3.2 Teste de hemólise e citotoxicidade com *Artemia salina*

Os testes de hemólise e de citotoxicidade (Tabelas 1 e 2, respectivamente) mostraram que na concentração de $4,00 \text{ mg.mL}^{-1}$ houve maior atividade hemolítica (33,95%) e citotoxicidade com 46,67% de mortalidade, valor superior ao controle negativo de 28,75%. As demais concentrações causaram mortalidade dos microcrustáceos abaixo do controle negativo.

3.3 Estudos *in vitro*

De forma a se ter um controle da influência do tempo de incubação do homogenato sobre a atividade da acetilcolinesterase, foi avaliada desde 2:30 até 60 minutos e, não mostrou variação significativa, $P > 0,05$ (dados não apresentados). Entretanto, a atividade da enzima em diferentes tempos de incubação com 45 mM de metilcarbamato (Tabela 3), apresentou significativa inibição, apenas com os tempos de 2:30 e 12:30 minutos, e um aumento significativo no tempo de 52:30. Já a atividade da enzima quando incubada com diferentes concentrações do extrato de *M. azedarach* mostrou uma curva em “U”, onde as concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mg mL^{-1} do extrato causaram diminuição significativa na atividade enzimática ($P < 0,05$); enquanto que as concentrações de 0,25 e 2,0 mg.mL^{-1} não influenciaram a atividade da acetilcolinesterase (Fig. 3). Nas Tabelas 4 e 5, observa-se o resultado do efeito do extrato nas concentrações de 1,0 mg.mL^{-1} e de 2,0 mg.mL^{-1} , respectivamente, sobre a acetilcolinesterase em homogenatos incubados com 45 mM de metilcarbamato. No

tempo de 32:30 minutos de incubação as concentrações de 1,0 mg.mL⁻¹ e 2,0 mg.mL⁻¹ conseguiram reverter o efeito do metilcarbamato sobre a acetilcolinesterase, com o retorno para valores próximos ao controle. A concentração de 2,0 mg.mL⁻¹, ainda, no tempo de 12:30 minutos reverteu o efeito inibitório do metilcarbamato, inclusive ativando significativamente a acetilcolinesterase (P = 0,0186).

3.4 Estudos *in vivo*

Na dose máxima, tanto nos machos (8.000 mg.Kg⁻¹), quanto nas fêmeas (5.000 mg.Kg⁻¹), a primeira sintomatologia observada foi dispneia (Tabela 6). Esta, com tendência a evoluir na intensidade com o decorrer do tempo. Seguido a isso, observou-se prostração, piloereção e ptose palpebral. Alguns animais apresentaram de leve a moderado ruído durante a respiração e também, sintomas relacionados à dor. Em todos os animais machos os sintomas evoluíram nas primeiras duas horas. No grupo que recebeu a dose máxima de metilcarbamato a prostração permaneceu com severa intensidade, enquanto que os demais sintomas oscilaram. A dispneia e a ptose palpebral mostraram um pico de maior intensidade na segunda hora, após a administração do metilcarbamato, Fig.4A. Os animais tratados com 5.000 mg.Kg⁻¹ de metilcarbamato mostraram o mesmo perfil na sintomatologia, Fig. 4B. Em relação ao grupo de fêmeas tratadas com metilcarbamato, o perfil da sintomatologia está apresentado nas Fig. 5A e 5B, para 5.000 mg.Kg⁻¹ e 2.500 mg.Kg⁻¹, respectivamente. Assim como no grupo de ratos machos, a sintomatologia tende a se intensificar nas primeiras duas horas e, que independente da dose administrada e do grupo animal, a sintomatologia é basicamente a mesma. Em relação a atividade enzimática foi observado que nos grupos de fêmeas, tanto a acetil- quanto a butirilcolinesterase mostraram-se com atividade diminuída. Por outro lado, nos grupos de machos a butirilcolinesterase mostrou-se ligeiramente diminuída, enquanto que a acetilcolinesterase teve aumento na sua atividade em relação ao grupo controle. As Fig. 6 e 7 mostram o perfil da atividade destas enzimas nos grupos controle e envenenado, respectivamente. Observa-se que as atividades enzimáticas oscilam no grupo controle. No entanto, no grupo envenenado há diminuição e retorno, há valores basais da atividade da acetilcolinesterase, enquanto que para a butirilcolinesterase ocorreu, inicialmente, um aumento na atividade para posteriormente ocorrer a sua diminuição. A Fig. 8. mostra a atividade da acetilcolinesterase após a administração do extrato de *M. azedarach* 125 mg.Kg⁻¹ em ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg⁻¹. Observou-se que a atividade se apresentou mais estável, próxima dos

valores basais, e com tendência a ativação nos primeiros 15 minutos. A partir de 60 minutos após a administração do extrato, começou a ocorrer a diminuição na atividade. A acetilcolinesterase em ratos envenenados e tratados com o extrato de *M. azedarach* 250 mg.Kg⁻¹ teve a sua atividade aumentada, já nos 5 minutos após o envenenamento, sugerindo ter capacidade de reversão sobre a enzima inibida (Fig. 9). O mesmo ocorreu com a butirilcolinesterase, que apresentou ativação na dose de 250 mg.Kg⁻¹ (Fig. 10); ao contrário da dose de 125 mg.Kg⁻¹ que se manteve inibida (Fig. 11). As atividades da acetil- e butirilcolinesterase no cérebro e fígado, respectivamente, não sofreram alteração em nenhum grupo tratado (envenenado, com o extrato ou que receberam tratamento), Fig. 12.

4. Discussão

A análise fitoquímica do extrato tamponado de *folhas de M. Azedarach*, após a partição líquido-líquido e a separação por cromatografia em camada delgada, confirmou a presença de compostos já descritos para esta planta[9]. Isto é de particular importância, visto que a utilização desta planta, tanto na medicina tradicional, quanto na popular, se dá por meio de infusão ou de decocção; demonstrando que o processo de extração aquoso tamponado foi suficiente para extrair constituintes bioativos da planta. A presença de flavonoides, através do espectro de absorção no UV, também foi considerada em outro estudo realizado com esta planta por Marek et al.[18], utilizando diferentes meios extrativos, dentre eles o tamponado. Em tal estudo, o efeito batocrômico foi o sinalizador da presença de compostos flavônicos com o deslocamento das bandas de absorção. No presente trabalho, os sinais encontrados em 3.2-4.8 ppm no espectro de RMN¹H são característicos de hidrogênios de carbonos ligados a elementos eletronegativos típicos de carbonos ligados com grupamentos hidroxilas, indicando também a presença de moléculas de açúcares neste extrato. Além disso, os picos presentes em < 2.7 ppm são característicos de moléculas alifáticas, podendo ser referentes a hidrogênios saturados, diferentemente das substâncias aromáticas as quais apresentariam sinais característicos em 6.0-7.7 ppm. A presença dos sinais muito pequenos encontrados na faixa dos compostos aromáticos pode ser indicativa de compostos flavonoides que sofreram substituição de hidrogênios do anel por hidroxilas, conferindo propriedades de quercetina ao composto, e assim, o número de hidrogênios ligados diretamente no anel aromático não é representado na faixa de 6.0-7.7 ppm[31, 32]. Desta forma, podemos considerar que os picos referentes aos hidrogênios das hidroxilas da quercetina estão deslocados, mesmo porque os hidrogênios ou hidroxilas isoladas, que poderiam estar presentes na faixa de compostos aromáticos, seriam apresentados por singletos. Em extrato hidroalcoólico 50% de *M. Azedarach* estudado por Rutkauski et al.[10], o espectro de RMN mostrou a presença de hidroxilas através de sinais em 3.2-4.8 ppm, região onde ficam registrados os hidrogênios característicos de carbonos ligados a elementos eletronegativos, indicando a presença de açúcares neste extrato. A presença de compostos flavônicos é de interesse, por estes serem hábeis em promover ligações de pontes de hidrogênios com aminoácidos de cadeias proteicas e exibirem afinidade de ligação com as esterases [33]. Apesar de poucos relatos de toxicidade da *M.*

Azedarachno, homem e destessero decorrentes da presença de tetranortriterpenoides ou meliatoxinas A1, A2, B1 e B2[34, 35], classe de compostos encontrada no presente extrato; este extrato mostrou baixa toxicidade. Estudos *in vitro* sobre a citotoxicidade foram realizados como uma avaliação preliminar do potencial tóxico do extrato empregado no presente trabalho. Nos dois modelos de citotoxicidade, atividade hemolítica e toxicidade sobre *Artemia salina*, o extratosó apresentou citotoxicidade na maior concentração avaliada, 4 mg.mL⁻¹. Tratando-se de um extrato bruto, esta toxicidade pode, também, ser decorrente da presença de alcaloides e de taninos no extrato. Com mecanismo tóxico complexo, os alcaloides interferem tanto em processos enzimáticos, quanto no transporte de cálcio, levando ao aumento de cálcio intracelular, o que afeta fortemente a integridade celular [36]. Além disso, assim como ostaninos, os alcaloides causam aglutinação ao interagir com proteínas ou com outros constituintes celulares [37, 38]. Embora estes achados indiquem toxicidade do extrato de *M. azedarach*, estudo com ratos não mostrou sinais de toxicidade em doses acima de 5.000 mg.Kg⁻¹ (dados não publicados). Isto é relevante, considerando a existência de compostos flavônicos no extrato, os quais são reconhecidamente inibidores da acetilcolinesterase[39]. Essa propriedade foi observada no estudo *in vitro*, onde ficou evidente que o efeito é dependente da concentração do extrato. O tipo de curva em “U” é característico de substâncias com ação bifásica, a exemplo a quercetina, um composto flavônico muito estudado pelas suas propriedades antioxidantes [40]. Este achado apoia a presença de compostos flavônicos no extrato. Desde que uma das ações do metilcarbamato sobre o sistema biológico seja a inibição da acetilcolinesterase e que a reversão desta enzima é importante no tratamento destes envenenamentos, optou-se por utilizar as concentrações de extrato que causou maior inibição (1,0 mg.mL⁻¹), e a que manteve a atividade mais próxima do controle (2,0 mg.mL⁻¹), para verificar se o extrato poderia induzir instabilidade no complexo enzima-metilcarbamato. Observou-se que ambas concentrações reverteram *in vitro* a inibição da acetilcolinesterase pelo metilcarbamato e que o tempo de reversão foi satisfatório, ocorrendo dentro do período de 12:30 e 32:30 minutos. Mais ainda, que a concentração de 2,0 mg.mL⁻¹ foi mais eficiente, conseguindo inclusive ativar a acetilcolinesterase. Considerando-se a gravidade e a rapidez do aparecimento da sintomatologia do envenenamento, este tempo foi satisfatório, visto que os experimentos *in vivo* mostraram um pico de aparecimento dos sintomas em 2 horas, seria indicado que a intervenção terapêutica deva ocorrer nas primeiras 2 horas após o episódio de exposição ao metilcarbamato. Mesmo porque a sintomatologia é

basicamente relacionada à ligação permanente da acetilcolina nos receptores muscarínicos e nicotínicos[41]. O tratamento com o extrato de *M. azedarach* nas duas doses estudadas mostrou um perfil de ativação na atividade da acetilcolinesterase, particularmente na dose mais elevada. Por outro lado, a atividade da acetilcolinesterase no cérebro não foi alterada. A presença de compostos flavônicos no extrato com possível afinidade pela acetilcolinesterase[42] podem ser os responsáveis por este efeito. Entretanto, mais estudos serão necessários para se esclarecer o mecanismo envolvido. Apesar da butirilcolinesterase ser geralmente a primeira enzima avaliada nos casos de envenenamentos por metilcarbamato, os dados encontrados no presente estudo mostraram que se deve ter cautela na sua interpretação, considerando a variação que ocorre na sua atividade, mesmo no grupo controle. Tendo como medida que a butirilcolinesterase ainda não tem uma função biológica totalmente definida, servindo as vezes como indicador de função hepática, outras vezes como indicador de exposição a alguns praguicidas, como enzima antioxidante e ainda, auxiliando na biotransformação de drogas; a sua interpretação deve ser feita com cautela[43–45]. Observou-se também que o período de até 120 minutos não foi suficiente para interferir significativamente na atividade da butirilcolinesterase no fígado. Mesmo o metilcarbamato tendo a sua principal biotransformação no fígado, a dose ou o tempo de exposição não foi suficiente para alterar a atividade desta enzima [2]. O mesmo foi observado em relação ao extrato nas doses estudadas.

Nossos resultados, particularmente da acetilcolinesterase, sugerem que o extrato de *M. azedarach* possui potencial de reverter a inibição induzida pelo metilcarbamato, podendo inclusive ativar a enzima. Mostram também, que se deve ter cautela ao avaliar a atividade da butirilcolinesterase em situações de exposição ao metilcarbamato. Com os dados aqui apresentados não foi possível esclarecer qual o mecanismo envolvido na reversão; para isso mais estudos serão necessários.

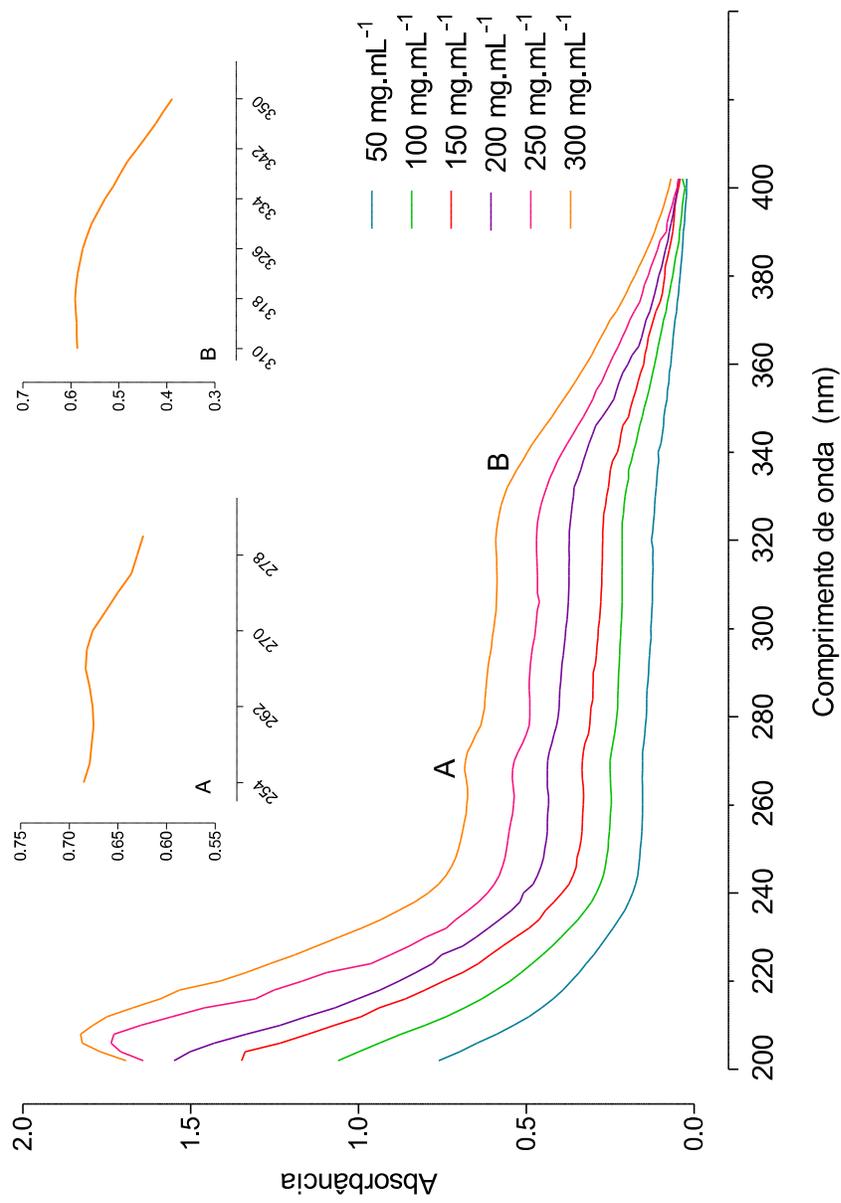


Fig. 1 Espectro de absorção no UV de diferentes concentrações do extrato tamponado de *Melia azedarach* L.

EBt amponado-H1
Tereza



Current Data Parameters
 NAME EBLamponado
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20140711
 Time 15.23
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB-
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT D2O
 NS 64
 DS 2
 SMH 6009.615 Hz
 FIDRES 0.091699 Hz
 AQ 5.452592 sec
 RG 91.51
 DW 83.200 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.2 K
 D1 1.0000000 sec
 TD0 1

CHANNEL f1
 SFO1 300.0610436 MHz
 NUC1 1H
 P1 15.25 usec
 PLW1 7.30000019 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 300.0589097 MHz
 WDM EM
 SSB 0
 LB 0
 GB 0
 PC 1.00

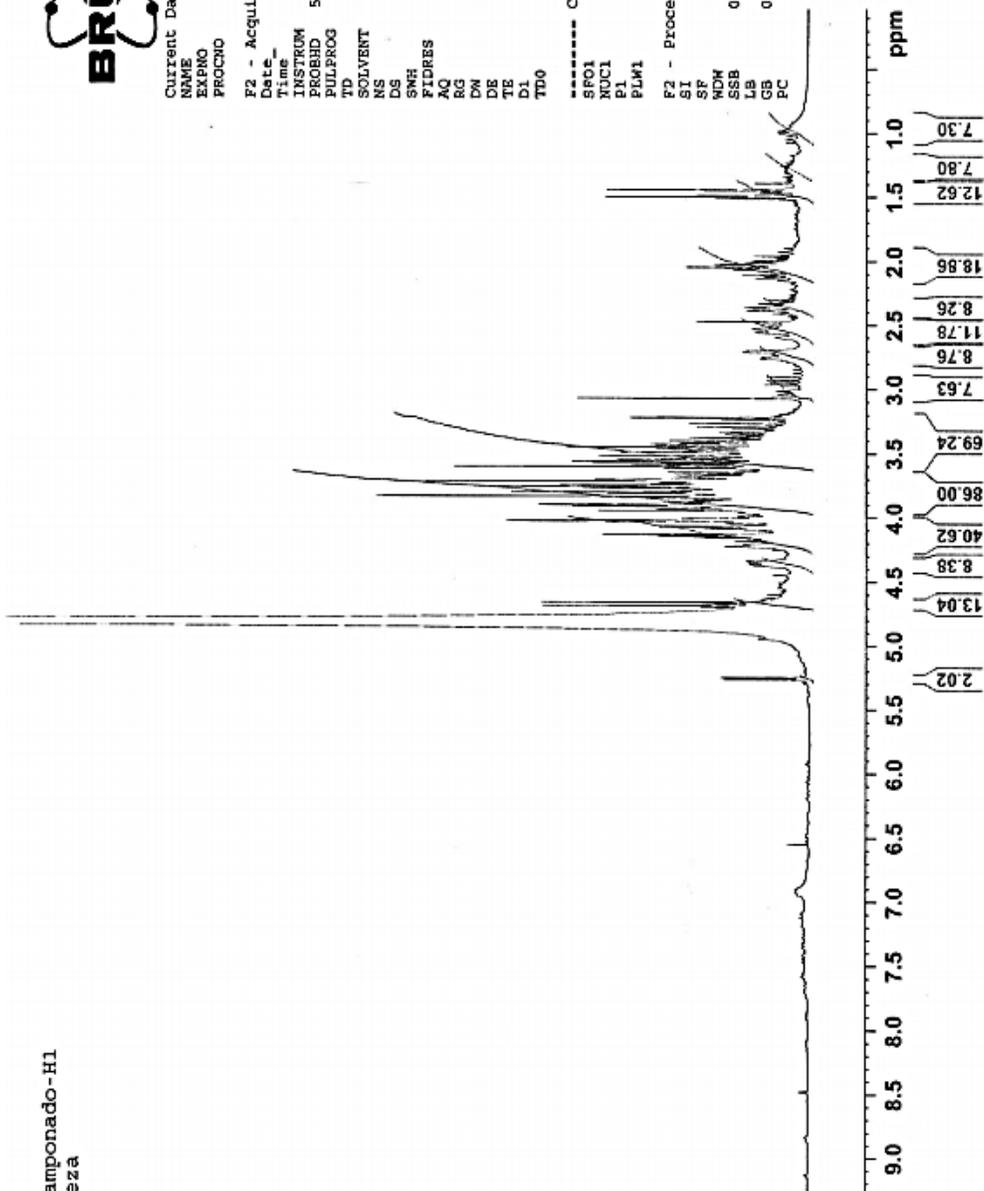


Fig. 2 RMN de ¹H do extrato tamponado de *Meila azedarach* L.

Tabela 1 Percentuais de eritrócitos intactos e de hemólise do extrato tamponado de *M. azedarach*.

	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Eritrócitos intactos (%)	Hemólise (%)
Extrato	0,25	95,69	4,31
	0,50	92,08	7,92
	1,00	89,13	10,87
	1,50	92,84	7,16
	2,00	83,39	16,61
	4,00	66,05	33,95
Controle Positivo		0,00	100,00
Controle Negativo		100,00	0,00

Tabela 2 Percentuais de mortalidade do microcrustáceo *Artemia salina* frente as diferentes concentrações do extrato tamponado de *M. azedarach*.

	Concentração (mg.mL ⁻¹)	Número de indivíduos totais	Número de indivíduos vivos	Mortalidade (%)
Extrato	0,50	30	23	23,33
	1,00	25	19	24,00
	2,00	30	23	23,33
	4,00	30	16	46,67
Controle Positivo		30	1	96,67
Controle Negativo		21	15	28,75

Tabela 3 Atividade da acetilcolinesterase após diferentes tempos de incubação com 45 mM de metilcarbamato.

Incubação (minutos)	Atividade da AChE (nmol.min ⁻¹ .mg ptna ⁻¹)		Valor de P
	Controle	Metilcarbamato 45 mM	
2:30	98,3 ± 3,85	64,5 ± 4,34** (↓34,4%)	0,0048
5:00	70,9 ± 1,30	66,6 ± 0,831 (↓ 4,30%)	0,1771
7:30	89,4 ± 14,6	78,1 ± 3,02 (↓ 12,6%)	0,5785
12:30	104,0 ± 3,97	58,5 ± 3,43* (↓ 43,8%)	0,0234
22:30	77,2 ± 11,5	69,7 ± 5,88 (↓ 9,72%)	0,6345
32:30	82,9 ± 13,2	87,8 ± 8,72 (↑ 5,91%)	0,8349
42:30	70,73 ± 2,43	50,13 ± 13,60 (↓ 29,1%)	0,1696
52:30	86,07 ± 0,79	96,48 ± 3,88* (↑12,1%)	0,0164
62:30	108,0 ± 14,7	71,9 ± 2,60 (↓ 33,4%)	0,0979

* P < 0,05; ** P < 0,01; ↓ inibição; ↑ ativação.

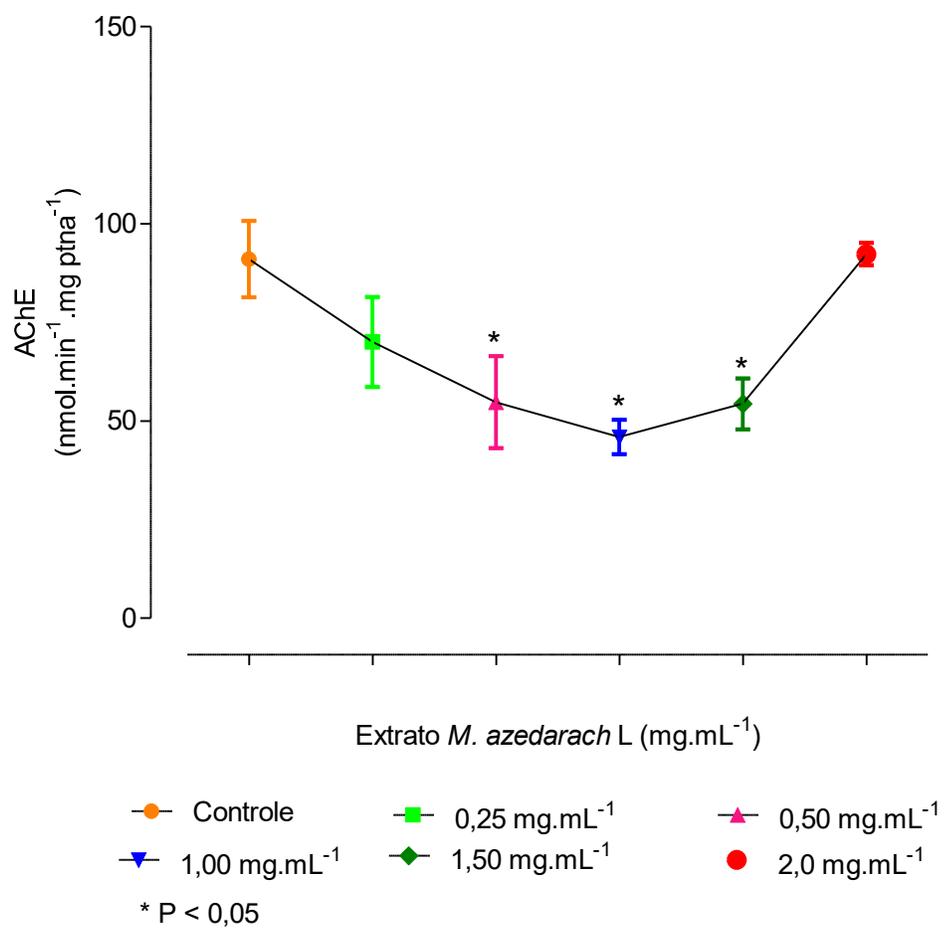


Fig. 3 Atividade da acetilcolinesterase em homogenato de cérebro de rato após a adição do extrato tamponado de *M. azedarach* em diferentes concentrações.

Tabela 4 Atividade da acetilcolinesterase após a adição de 1,0 mg.mL⁻¹ de extrato tamponado de *M. azedarach* em homogenatos de cérebro de ratos incubados com 45 mM de metilcarbamato.

Incubação (minutos)	Atividade da AChE (nmol.min ⁻¹ .mg ptna ⁻¹)			Valor de P
	Controle	Metilcarbamato 45 mM	Metilcarbamato 45 mM + 1,0 mg.mL ⁻¹ de extrato	
2:30	94,5 ± 5,25	71,1 ± 2,61	104,0 ± 16,1	0,1427
5:00	102,0 ± 7,68	69,6 ± 3,77	67,6 ± 6,71	0,8478
12:30	114,0 ± 1,01	86,3 ± 2,78	87,2 ± 2,17	0,8333
32:30	107,0 ± 5,80	91,4 ± 2,36	108,0 ± 2,75*	0,0110

* $P < 0,05$.

Tabela 5 Atividade da acetilcolinesterase após a adição de 2,0 mg.mL⁻¹ de extrato tamponado de *M. azedarach* em homogenatos de cérebro de ratos incubados com 45 mM de metilcarbamato.

Incubação (minutos)	Atividade da AChE (nmol.min ⁻¹ .mg ptna ⁻¹)			Valor de P
	Controle	Metilcarbamato 45 mM	Metilcarbamato 45 mM + 2,0 mg.mL ⁻¹ de extrato	
2:30	98,3 ± 3,85	64,5 ± 4,34**	57,1 ± 7,92	0,5861
5:00	89,4 ± 14,6	78,1 ± 3,02	91,96 ± 23,5	0,5815
12:30	77,2 ± 11,5	69,7 ± 5,88	124,0 ± 2,92*	0,0186
32:30	108,0 ± 14,7	71,9 ± 2,60	99,4 ± 3,31*	0,0202

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

Tabela 6 Análise qualitativa do número de mortes e sintomatologia apresentada por ratos submetidos a intoxicação por metilcarbamato.

Grupo	Dose (mg.Kg ⁻¹)	Mortes (%)	Tempo médio (h) ^a	Sintoma clínico característico
				Intensidade
Fêmeas	5.000	67	1 – 2	Dispneia 2 Piloereção 2 Prostação 2 Ptose palpebral 2
	2.500	0	1 – 2	Dispneia 2 Piloereção 2 Prostação 2 Ptose palpebral 2
Machos	8.000	100	1 – 3	Dispneia 2 Piloereção 2 Prostação 3 Ptose palpebral 3
	5.000	0	4	Dispneia 3 Piloereção 2 Prostação 3 Ptose palpebral 2

^a tempo do aparecimento de maior intensidade da sintomatologia.

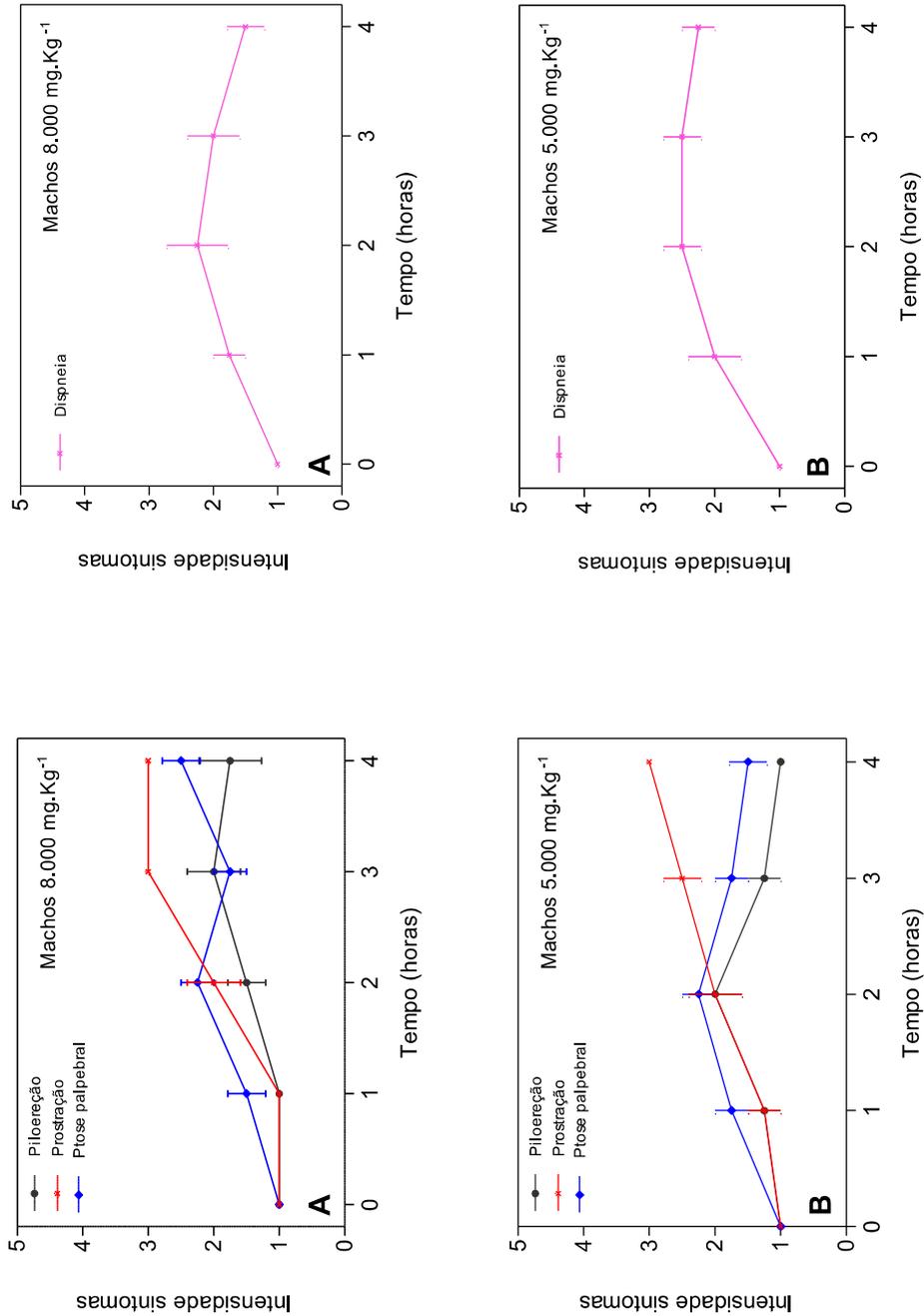


Fig. 4 Perfil da intensidade da sintomatologia apresentada pelos ratos machos nas primeiras 4 horas. A - Após a administração de 8.000 mg.Kg⁻¹ de metilcarbamato. B - Após a administração de 5.000 mg.Kg⁻¹ de metilcarbamato.

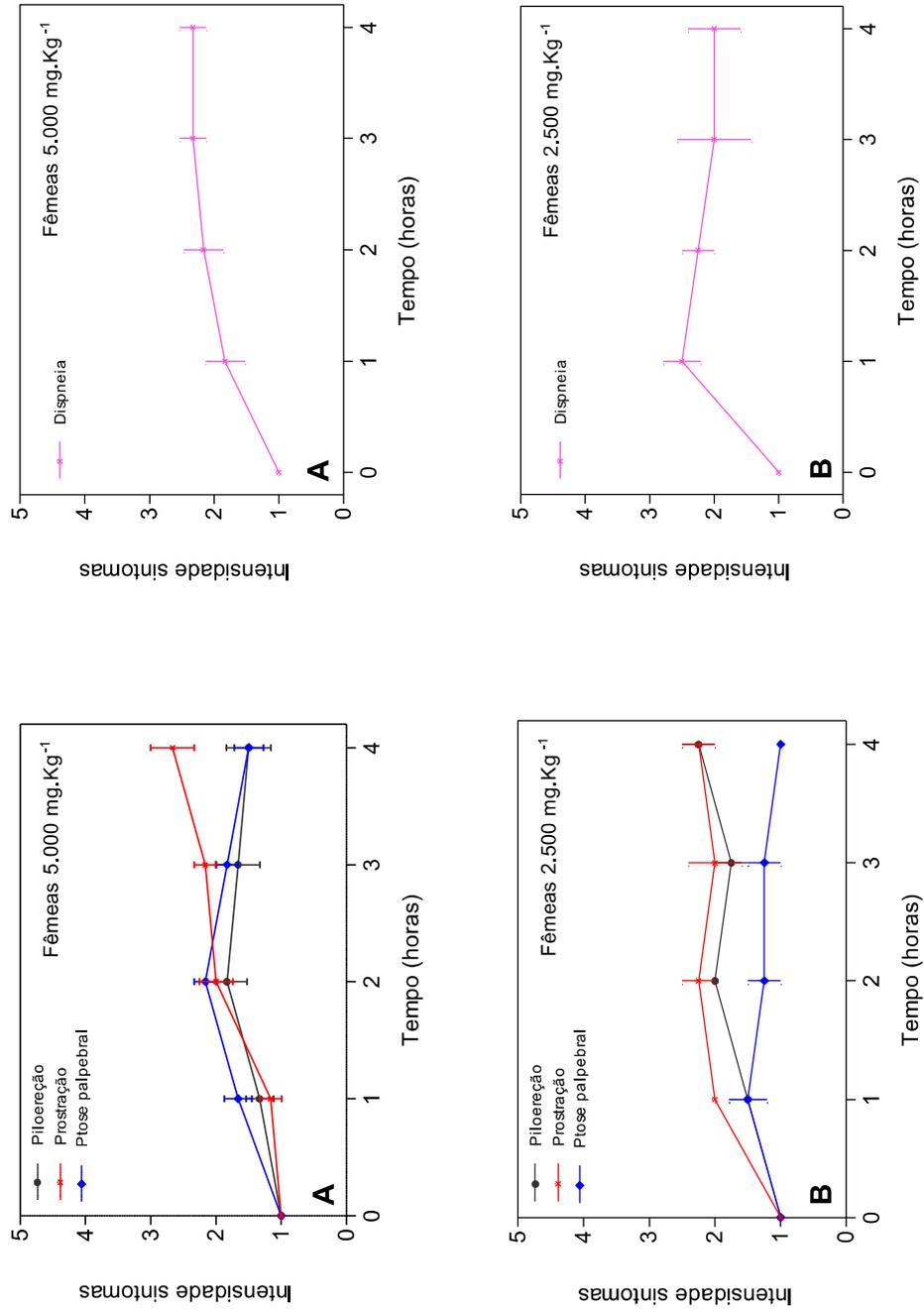


Fig. 5 Perfil da intensidade da sintomatologia apresentada pelas ratas fêmeas nas primeiras 4 horas. A - Após a administração de 5.000 mg.Kg⁻¹ de metilcarbarnato. B - Após a administração de 2.500 mg.Kg⁻¹ de metilcarbarnato.

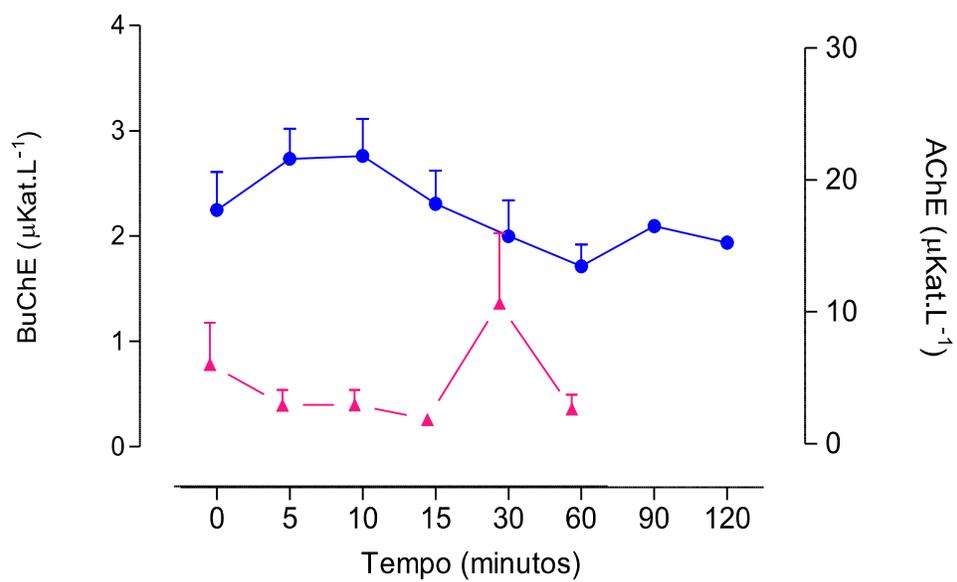


Fig. 6 Perfil da atividade da acetil- e butirilcolinesterase em ratos controle.

● acetilcolinesterase ▲ butirilcolinesterase

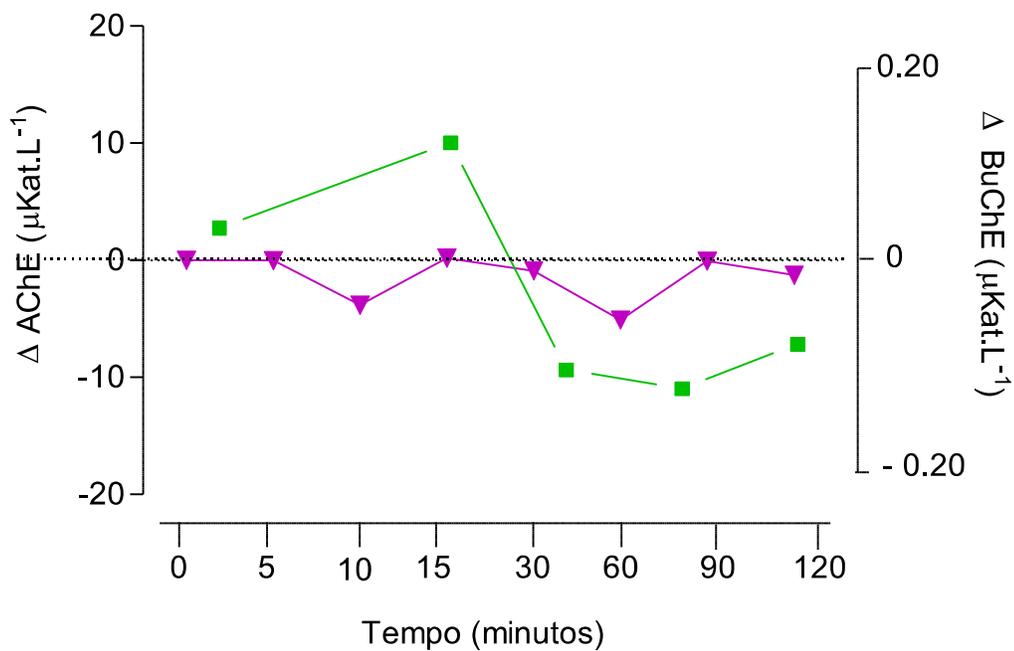


Fig. 7 Perfil da atividade da acetil- e butirilcolinesterase em ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} . Os valores são a diferença entre as atividades dos tempos de 5 a 120 minutos e o tempo "0" minutos quando comparados com o grupo controle (atividade basal).

▼ acetilcolinesterase ■ butirilcolinesterase

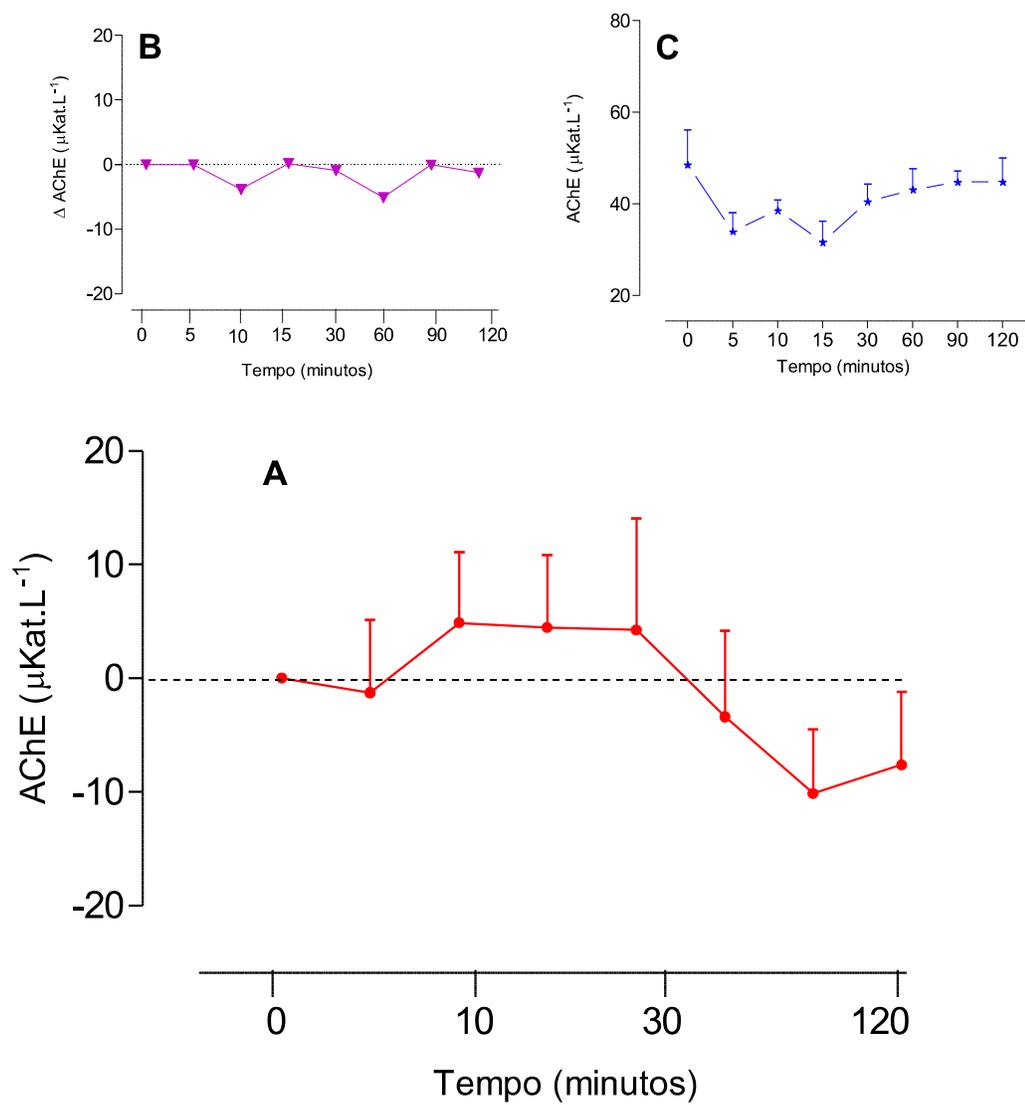


Fig. 8 Perfil da atividade da acetilcolinesterase. A: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} e tratados com extrato de *M. azedarach* 125 mg.Kg^{-1} . B: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} . C: Ratos tratados apenas com *M. azedarach* 125 mg.Kg^{-1} .

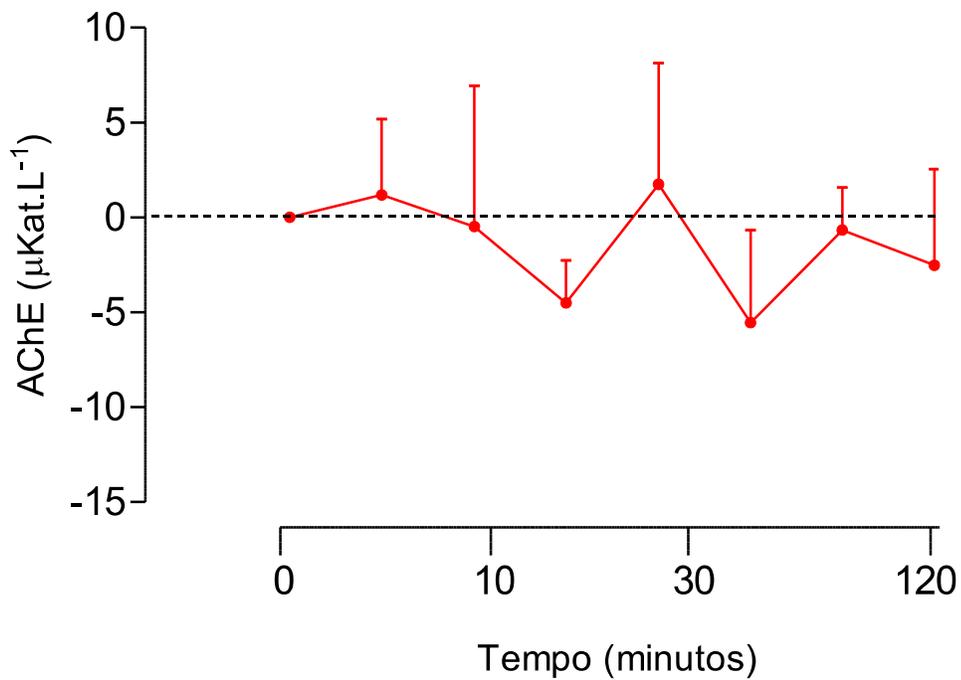


Fig. 9 Perfil da atividade da acetilcolinesterase. A: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} e tratados com extrato de *M. azedarach* 250 mg.Kg^{-1} . B: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} . C: Ratos tratados apenas com *M. azedarach* 250 mg.Kg^{-1} .

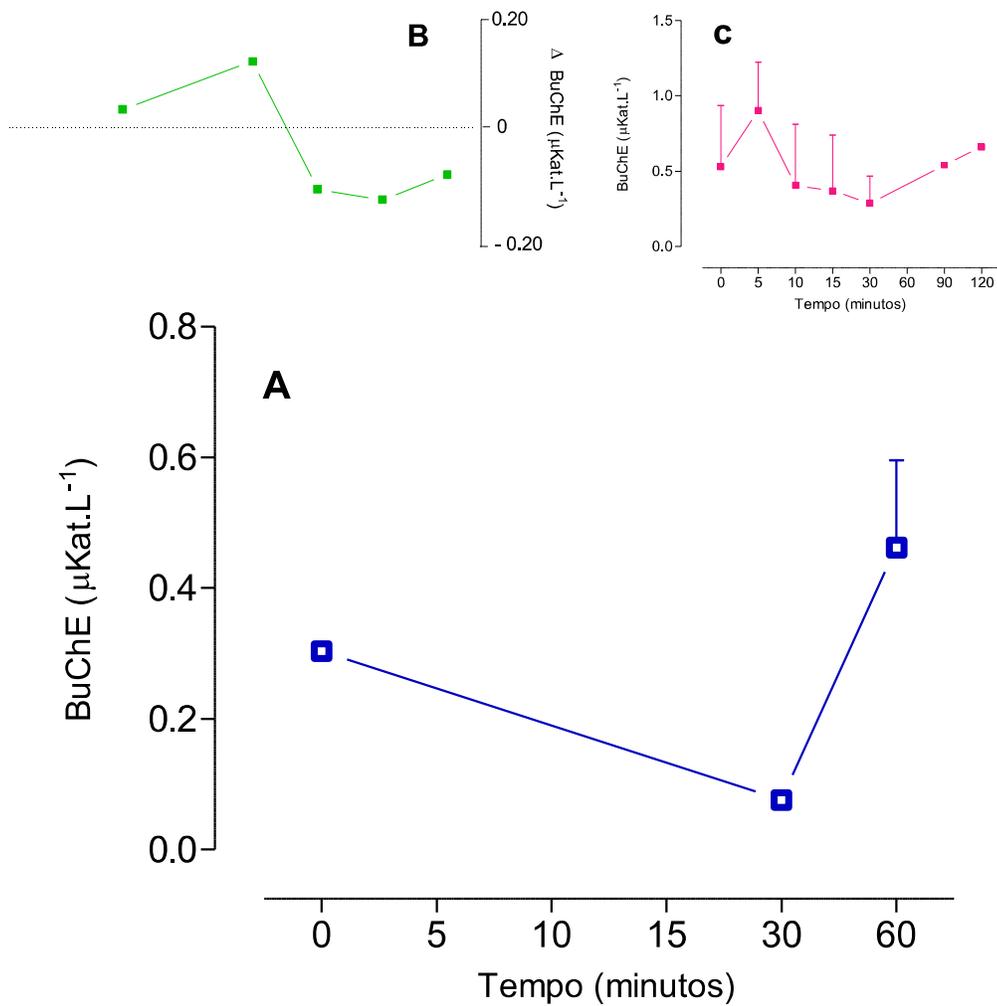


Fig. 10 Perfil da atividade da butirilcolinesterase. A: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} e tratados com extrato de *M. azedarach* 250 mg.Kg^{-1} . B: Ratos envenenados com metilcarbamato 40 mg.Kg^{-1} . C: Ratos tratados apenas com *M. azedarach* 250 mg.Kg^{-1} .

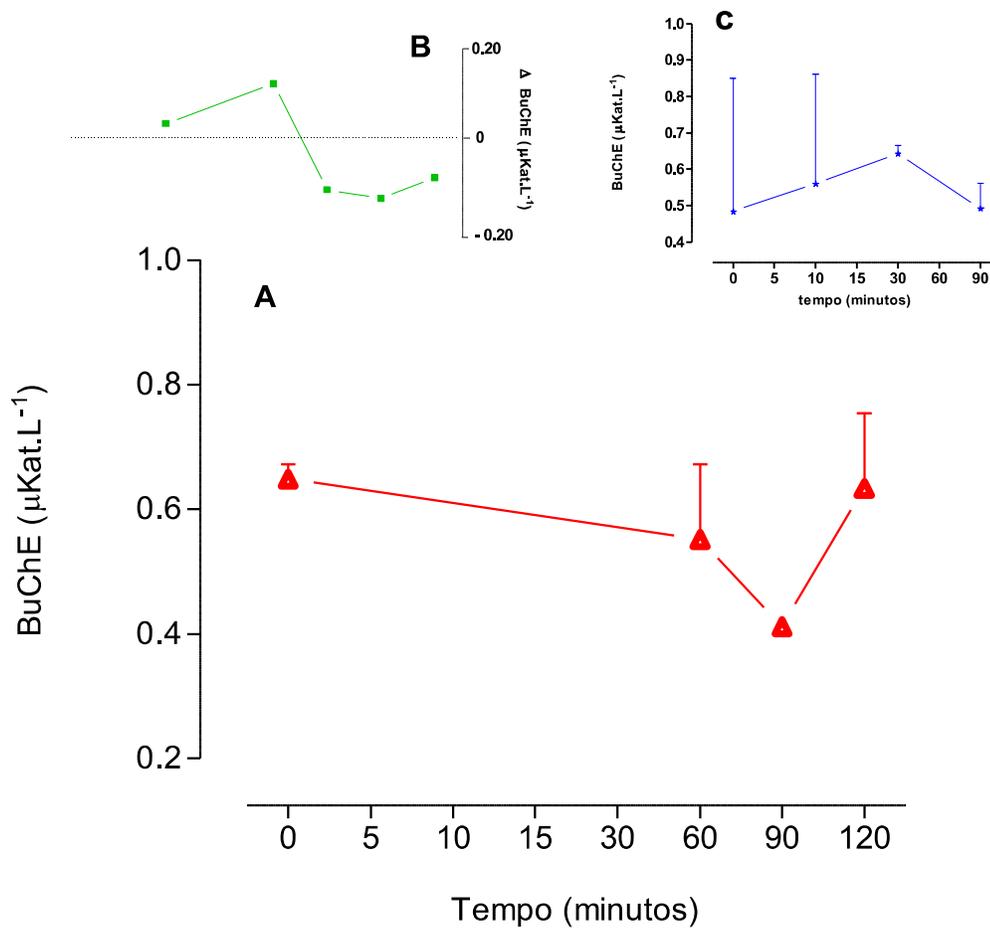


Fig. 11 Perfil da atividade da butirilcolinesterase. A: Ratos envenenados com metilcarbarnato 40 mg.Kg⁻¹ e tratados com extrato de *M. azedarach* 125 mg.Kg⁻¹. B: Ratos envenenados com metilcarbarnato 40 mg.Kg⁻¹. C: Ratos tratados apenas com *M. azedarach* 125 mg.Kg⁻¹.

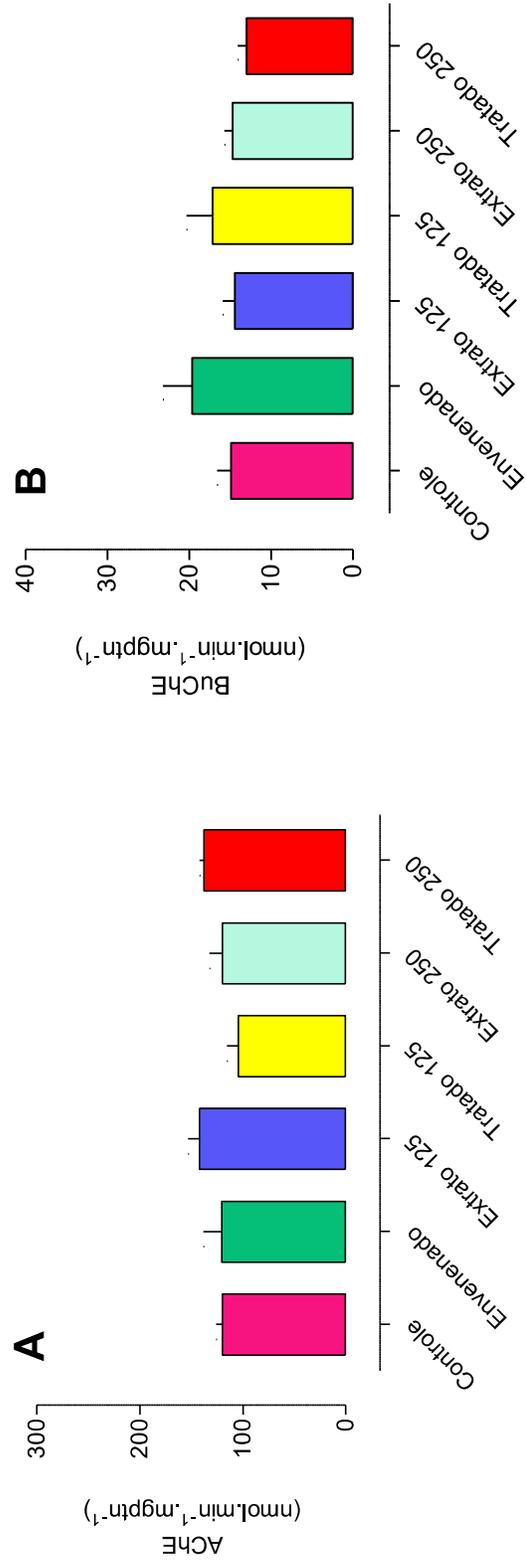


Fig. 12 A: Atividade da acetilcolinesterase no cérebro. B: Atividade da butirilcolinesterase no fígado.
(Concentrações do Extrato de *Melia azedarach* L. expressas em mg.kg⁻¹)

Conflitode Interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse na presente pesquisa.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação Araucária e a Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA) pelo apoio financeiro.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O extrato de *M. azedarach* apresenta potencial efeito sobre a atividade da enzima inibida pelo metilcarbamato, principalmente da acetilcolinesterase, mostrando que a reversão da inibição é possível. Com relação a butirilcolinesterase, deve-se ter cautela ao avaliar suas condições de atividade em situações de exposição ao metilcarbamato. Ainda, são necessários mais estudos para esclarecer o mecanismo envolvido na reversão da enzima inibida.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do preparo e caracterização do extrato tamponado de *Melia azedarach* L., pode-se afirmar que foi possível extrair com eficácia compostos bioativos desta planta. Os estudos *in vitro* mostraram que o extrato apresenta baixa toxicidade, este fato deve-se possivelmente a presença de compostos flavônicos, dentre eles, as quercetinas. Apenas nas concentrações mais elevadas ele se torna prejudicial, podendo atribuir seu caráter tóxico a presença de alcaloides e taninos.

Percebe-se claramente que, o efeito do extrato tamponado de *M. azedarach* é dependente da concentração, conferindo aos compostos presentes, características de substâncias com ação bifásica, a exemplo das quercetinas que têm essa característica por serem substâncias de natureza flavônica e com ação antioxidante.

Ainda *in vitro*, verificou-se que a inibição induzida pelo metilcarbamato pode ser revertida pela ação do extrato tamponado de *M. Azedarach* com o decorrer do tempo. Considerando a gravidade e rapidez dos sintomas (característicos da crise colinérgica), os resultados *in vivo* mostraram que a intervenção deve ser feita nas duas primeiras horas após a intoxicação.

Assim, com o tratamento *in vivo* de ratos que receberam metilcarbamato, podemos perceber que existe um perfil de ativação da atividade da acetilcolinesterase na maior dose do extrato administrado (250 mg.Kg⁻¹). A presença dos compostos flavônicos no extrato, com possível afinidade pela acetilcolinesterase podem ser os responsáveis por este efeito. Contudo, serão necessários mais estudos para se esclarecer o mecanismo de ação envolvido.

Com relação a butirilcolinesterase, devemos considerar que esta enzima não tem ação devidamente esclarecida e por isso, deve-se ter cautela na interpretação dos resultados, uma vez que o período de 120 minutos não foi suficiente para traçar um perfil significativo para a atividade desta enzima no sangue e, no fígado também não houveram alterações significativas, embora o metilcarbamato tenha sua metabolização hepática.

7. REFERÊNCIAS

7.1. Referências da Revisão de Literatura

ALCHÉ, L. E.; ASSAD FERREK, G.; MEO, M.; COTO, C. E.; MAIER, M. S. An antiviral meliacarpin from leaves of *Melia azedarach* L. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 58, n. 3-4, p. 215-219, 2002.

AL-KHAFAJI, N. J.; AL-FARWACHI, M. I. Experimental *Melia azedarach* (Sibbah) intoxication in rabbits. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 13, n. 1, p. 81-92, 2000.

ALMEIDA, M. M. B.; ARRIAGA, A. M. C.; DOS SANTOS, A. K. L.; LEMOS, T. L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Química nova**, v. 30, n. 4, p. 935, 2007.

ALZOHAIRY, M. A. Therapeutics role of *Azadirachta indica* (Neem) and their active constituents in diseases prevention and treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Agrotóxico utilizado como chumbinho é retirado do mercado brasileiro, 2012**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+interesse/noticias/agrotoxico+utilizado+como+chumbinho+e+retirado+do+mercado+brasileiro>>. Acesso em janeiro de 2015.

BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, T. H.; ALENCAR, A. A.; BATISTA, L. M.; OLIVEIRA, R. A.; GUEDES, D. N.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 392-413, 2005.

BARON, R. L. A carbamate insecticide: a case study of aldicarb. **Environmental health perspectives**, v. 102, n. Suppl 11, p. 23, 1994.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química nova**, p. 679-688, 2009.

BEHLING, E. V.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. D. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2008.

BERTOLETE, J. M.; FLEISCHMANN, A.; EDDLESTON, M.; GUNNELL, D. Deaths from pesticide poisoning: a global response. **The British Journal of Psychiatry**, v. 189, n. 3, p. 201-203, 2006.

BREUER, M.; HOSTE, B.; DE LOOF, A.; NAQVI, S. N. H. Effect of *Melia azedarach* extract on the activity of NADPH-cytochrome c reductase and cholinesterase in insects. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 76, n. 3, p. 99-103, 2003.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012.

BULLANGPOTI, V.; WAJNBERG, E.; AUDANT, P.; FEYEREISEN, R. Antifeedant activity of *Jatropha gossypifolia* and *Melia azedarach* senescent leaf extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and their potential use as synergists. **Pest management science**, v. 68, n. 9, p. 1255-1264, 2012.

CALA, A. C.; CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. S.; MATOS, A. P.; BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; OLIVEIRA, G. P. *In vitro* anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichilia clausenii* C. against sheep gastrointestinal nematodes. **Experimental parasitology**, v. 130, n. 2, p. 98-102, 2012.

CARPINELLA, C.; FERRAYOLI, C.; VALLADARES, G.; DEFAGO, M.; PALACIOS, S. Potent limonoid insect antifeedant from *Melia azedarach*. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 66, n. 8, p. 1731-1736, 2002.

CARSTENS, E.; MOBERG, G. P. Recognizing pain and distress in laboratory animals. **Ilar Journal**, v. 41, n. 2, p. 62-71, 2000.

CASIDA, J. E.; DURKIN, K. A. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. **Annual review of entomology**, v. 58, p. 99-117, 2013.

CCIn – CENTRO DE CONTROLE DE INTOXICAÇÕES. **Intoxicações Exógenas Agudas por Carbamatos, Organofosforados, Compostos Bipiridílicos e Piretróides.** Niterói, RJ, 2000. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/tutorial2/fulltex/intoxicacoes.pdf>>. Acesso em 15 de maio de 2016.

CHAKRABORTY, S.; MUKHERJEE, S.; ROYCHOUHDURY, S.; SIDDIQUE, S.; LAHIRI, T.; RAY, M. R. Chronic exposures to cholinesterase-inhibiting pesticides adversely affect respiratory health of agricultural workers in India. **Journal of occupational health**, v. 51, n. 6, p. 488-497, 2009.

CIMASONI, G. Inhibition of cholinesterases by fluoride *in vitro*. **Biochemical Journal**, v. 99, n. 1, p. 133, 1966.

COLOVIC, M. B.; KRSTIC, D. Z.; LAZAREVIC-PASTI, T. D.; BONDZIC, A. M.; VASIC, V. M. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. **Current neuropharmacology**, v. 11, n. 3, p. 315-335, 2013.

CORTINOVIS, C. & CALONI, F. Epidemiology of intoxication of domestic animals by plants in Europe. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 2, p. 163-168, 2013.

COSTA, W. S.; SUASSUNA JR, J.; MATA, M. E. R. M. C.; QUEIROZ, A. J. M. Influência da concentração de sólidos solúveis totais no sinal fotoacústico de polpa de manga. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 6, n. 2, p. 141-147, 2004.

DA SILVA, L.R, MARTINS, L.D.V.; CALOU, I.B.F.; MEIRELES DE DEUS, M.D.S.; FERREIRA, P.M.P. & PERON, A.P. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23 n.1, 2015.

DE ARAÚJO, S. A. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. U. M.; MELO, V. S. P.; LIMA, F. E. S.; RICARTE, A. R. F.; MIRANDA, A. M. Usos potenciais de *Melia azedarach* (Meliaceae): Um levantamento. **Arq. Inst. Biol. São Paulo**, v. 76, n. 1, p. 141-8, 2009.

DE SIQUEIRA, A.; SALVAGNI, F. A.; YOSHIDA, A. S.; GONÇALVES-JUNIOR, V.; CALEFI, A. S.; FUKUSHIMA, A. R.; MAIORKA, P. C. Poisoning of cats and dogs by the carbamate pesticides aldicarb and carbofuran. **Research in veterinary science**, v. 102, p. 142-149, 2015.

DELLA BONA, A.; NEDEL, F. Evaluation of *Melia azedarach* Extracts Against *Streptococcus mutans*. **Journal of medicinal food**, v. 18, n. 2, p. 259-263, 2015.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T. D.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F. D.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 3, p. 241-249, 2009.

DOWLING, K. C.; SEIBER, J. N. Importance of respiratory exposure to pesticides among agricultural populations. **International journal of toxicology**, v. 21, n. 5, p. 371-381, 2002.

EDDLESTON, M.; BUCKLEY, N. A.; EYER, P.; DAWSON, A. H. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. **The Lancet**, v. 371, n. 9612, p. 597-607, 2008.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-95, 1961.

FANG X.; DI Y.T.; HAO X. J. The advances in the limonoid chemistry of the Meliaceae family. **Current Organic Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 1363-1391, 2011.

FORLENZA, O. V. Tratamento farmacológico da doença de Alzheimer. **Rev. Psiqu. Clín.**, v. 32, n. 3, p. 137-148, 2005.

FRIEDMAN, A.; KAUFER, D.; SHEMER, J.; HENDLER, I.; SOREQ, H.; TUR-KASPA, I. Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response. **Nature medicine**, v. 2, n. 12, p. 1382-1385, 1996.

GEMEDA, B. S.; HASSEN, A. Effect of tannin and species variation on *in vitro* digestibility, gas, and methane production of tropical browse plants. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 28, n. 2, p. 188, 2015.

GOLDFRANK, L.R.; FLOMENBAUM, N.E.; LEWIN, N.A.; WEISMAN, R.S.; HOWLAND, M.A. & HOFFMAN, R.S. **Goldfrank's Toxicologic Emergencies**. 5. ed. Norwalk: Appleton & Lange. 1105:1114, 1994.

GOSWAMY, R.; CHAUDHURI, A.; MAHASHUR, A. A. Study of respiratory failure in organophosphate and carbamate poisoning. **Heart & lung: the journal of critical care**, v. 23, n. 6, p. 466-472, 1993.

GUALDANI, R.; CAVALLUZZI, M.M.; LENTINI, G. & HABTEMARIAM, S. The Chemistry and Pharmacology of Citrus Limonoids. **Molecules**, v. 21 n. 11, p. 1530, 2016.

HOFMANN, J. N.; KEIFER, M. C.; DE ROOS, A. J.; FENSKE, R. A.; FURLONG, C. E.; VAN BELLE, G.; CHECKOWAY, H. Occupational determinants of serum cholinesterase inhibition among organophosphate-exposed agricultural pesticide handlers in Washington State. **Occupational and environmental medicine**, p. oem. 2009.046391, 2009.

HUANG, T. L.; SZÉKÁCS, A.; UEMATSU, T.; KUWANO, E.; PARKINSON, A.; HAMMOCK, B. D. Hydrolysis of carbonates, thiocarbonates, carbamates, and carboxylic esters of α -naphthol, β -naphthol, and p-nitrophenol by human, rat, and mouse liver carboxylesterases. **Pharmaceutical research**, v. 10, n. 5, p. 639-648, 1993.

HUANG, Y. J.; HUANG, Y.; BALDASSARRE, H.; WANG, B.; LAZARIS, A.; LEDUC, M.; TOUATI, M. Recombinant human butyrylcholinesterase from milk of transgenic animals to protect against organophosphate poisoning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 34, p. 13603-13608, 2007.

ISMAIL, F.M.; LEVITSKY, D.O. & DEMBITSKY, V.M. Aziridine alkaloids as potential therapeutic agents. **European journal of medicinal chemistry**, v. 44 n. 9, p. 3373-3387, 2009.

JORGE, T. C.; LENARTOVICZ, V.; ANDRADE, M. W.; BONAFIN, T.; GIORDANI, M. A.; BUENO, N. B.; SCHNEIDER, D. S. L. G. Pediculicidal activity of hydroethanolic extracts of *Ruta graveolens*, *Melia azedarach* and *Sambucus australis*. **Lat. Am. J. Pharm**, v. 28, n. 3, p. 457-459, 2009.

KING, A. M.; AARON, C. K. Organophosphate and carbamate poisoning. **Emergency medicine clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 133-151, 2015.

KONICKX, L. A.; BINGHAM, K.; EDDLESTON, M. Is oxygen required before atropine administration in organophosphorus or carbamate pesticide poisoning?—A cohort study. **Clinical Toxicology**, v. 52, n. 5, p. 531-537, 2014.

KUMAZAWA, S.; KUBOTA, S.; YAMAMOTO, H.; OKAMURA, N.; SUGIYAMAB, Y.; KOBAYASHIA, H.; OHTA, T. Antiangiogenic activity of flavonoids from *Melia azedarach*. **Natural product communications**, v. 8, n. 12, p. 1719-1720, 2013.

LANNATE: S-methyl N-(methylcarbamoxyloxy)thioacetimidate (METOMIL). Bula de inseticida sistêmico e de contato. São Paulo: DU PONT DO BRASIL S.A., 2015.

- LARINI, L. **Toxicologia dos praguicidas**. 1. ed. São Paulo: Manole Ltda. 76:87, 1999.
- LARINI, L. **Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Manoele Ltda. 164:171, 1997.
- LATOUD, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; GENET, R.; MORGAT, J. L. Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 856, n. 3, p. 526-535, 1986.
- LEIBSON, T. & LIFSHITZ, M. Organophosphate and carbamate poisoning: review of the current literature and summary of clinical and laboratory experience in southern Israel. **The Israel Medical Association Journal**, v. 10, n. 11, p. 767, 2008.
- LIFSHITZ, M.; SHAHAK, E.; SOFER, S. Carbamate and organophosphate poisoning in young children. **Pediatric emergency care**, v. 15, n. 2, p. 102-103, 1999.
- LIN, J. N.; LIN, C. L.; LIN, M. C.; LAI, C. H.; LIN, H. H.; YANG, C. H.; KAO, C. H. Increased risk of dementia in patients with acute organophosphate and carbamate poisoning: a nationwide population-based cohort study. **Medicine**, v. 94, n. 29, 2015.
- LING, L.J.; CLARK, R.F.; ERICKSON, T.B. & TRESTRAIL, J.H. **Segredos em Toxicologia: Respostas necessárias ao dia-a-dia em rounds, no serviço de emergência, em exames orais e escritos**. Porto Alegre: Artmed. 233-237, 2005.
- LORENZI, H. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2003.
- LOTTI M. & MORETTO A. Muscle & Nerve. **Issues & Opinions**, 34(4):499-502, 2006.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.
- MANADAS, R.; PINA, M. E.; VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.
- MAREK, C. B.; ITINOSE, A. M.; JORGE, T. C. M.; TEBALDI, N. R.; REICHERT, A. M. Influence of leaf extracts from *Melia azedarach* L. on butyrylcholinesterase activity in rat liver. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 22, p. 3931-3938, 2012.
- MASSOULIÉ, J.; PEZZEMENTI, L.; BON, S.; KREJCI, E.; VALLETTE, F. M. Molecular and cellular biology of cholinesterases. **Progress in neurobiology**, v. 41, n. 1, p. 31-91, 1993.
- MCDANIEL, K. L.; PADILLA, S.; MARSHALL, R. S.; PHILLIPS, P. M.; PODHORNIAK, L.; QIAN, Y.; MOSER, V. C. Comparison of acute neurobehavioral and cholinesterase inhibitory effects of N-methylcarbamates in rat. **Toxicological sciences**, v. 98, n. 2, p. 552-560, 2007.
- MÉNDEZ, C.; ARAGÃO, M.; FABIANA, E.; RIET-CORREA, F.; JUAN GIMENO, E. Experimental intoxication by the leaves of *Melia azedarach* (Meliaceae) in cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 19-24, 2002.

MÉNDEZ, C.; ARAGÃO, M.; FABIANA, E.; RIET-CORREA, F.; JUAN GIMENO, E. Intoxicação experimental com frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em suínos1. **Pesq. Vet. Bras**, v. 26, n. 1, p. 26-30, 2006.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v. 45, n. 05, p. 31-34, 1982.

MICHELIN, D. C.; IHA, S. M.; RINALDO, D.; SANNOMIYA, M.; SANTOS, L. C. D.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 209-211, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília-DF, 2006. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterapicos.pdf>, Acesso em: 17 de Maio de 2016.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. D.; ARAÚJO, E. D. L.; AMORIM, E. L. C. D. Tannis: from chemistry to ecology. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

MORTON, D. B.; GRIFFITHS, P. H. M. **Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment**. 1985.

MOTTA, V. T. Bioquímica básica. **Autolab Análises Clínicas, cap**, v. 9, p. 227, 2006.

NATH M.C.; CHAKRAVORTY M.K., CHOWDHURY S.R. LiebermannBuchard reaction for steroids. **Nature**. 157: 103-104. 1946.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Methyl Carbamate (CAS No. 598-55-0) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). **National Toxicology Program technical report series**, v. 328, p. 1, 1987.

NOMEIR, A. A.; IOANNOU, Y. M.; SANDERS, J. M.; MATTHEWS, H. B. Comparative metabolism and disposition of ethyl carbamate (urethane) in male Fischer 344 rats and male B6C3F1 mice. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 97, n. 2, p. 203-215, 1989.

NORDBERG, A.; SVENSSON, A. Cholinesterase inhibitors in the treatment of Alzheimer's disease. **Drug safety**, v. 19, n. 6, p. 465-480, 1998.

OHAYO-MITOKO, G. J.; KROMHOUT, H.; SIMWA, J. M.; BOLEIJ, J. S.; & HEEDERIK, D. Self reported symptoms and inhibition of acetylcholinesterase activity among Kenyan agricultural workers. **Occupational and environmental medicine**, v. 57, n. 3, p. 195-200, 2000.

OLIVEIRA, R.D.R.; MENEZES, J.B. Intoxicações exógenas em clínica médica. **Medicina**, v. 36, n. 2/4, p. 472-479, 2003.

OLIVEIRA-SILVA, J.J.; ALVES, S.R.; MEYER, A.; PERES, F.; MATOS, R.C.O.; SARCINELLI, P.N. et al. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos. **Revista Saúde Pública**, v. 35, n. 2, p. 130-135, 2001.

ORFALI, G. D. C.; DUARTE, A. C.; BONADIO, V.; MARTINEZ, N. P.; DE ARAÚJO, M. E. M. B.; PRIVIERO, F. B. M.; PRIOLLI, D. G. Review of anticancer mechanisms of isoquercitin. **World journal of clinical oncology**, v. 7, n. 2, p. 189, 2016.

PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L. D.; SERAFINI, L. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Rev. bras. farmacogn**, v. 13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PARANÁ. Secretaria da Saúde. **Intoxicação por agrotóxicos**. Paraná, 2014. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses_intoxicacoes/Intoxicacao_por_Agrototoxicos>. Acesso em: 2 de maio de 2016.

PARANÁ. Secretaria da Saúde. **Uso de fitoterápicos e plantas medicinais cresce no SUS**. Paraná, 2016. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/24205-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus>>. Acesso em: 05 de janeiro de 2017.

PENNINGTON, T. D.; STYLES, B. T. A generic monograph of the Meliaceae. **Blumea**, v. 22, n. 3, p. 419-540, 1975.

PERES, F.; OLIVEIRA-SILVA, J.J.; DELLA-ROSA, H.V. & LUCCA, S.D. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Cien Saude Colet**, v. 10, 2005.

PETRONILHO, E. C. FIGUEROA-VILLAR, J. D. Agentes para Defesa Contra Guerra Química: Reativadores da Acetilcolinesterase Inibida com Organofosforados Neurotóxicos. **Revista Virtual de Química**, 6(3), 671-686, 2014.

PHUA, D. H.; TSAI, W. J.; GER, J.; DENG, J. F.; YANG, C. C. Human *Melia azedarach* poisoning. **Clinical Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 1067-1070, 2008.

POHANKA, M. Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. **Biomedical Papers**, v. 155, n. 3, p. 219-223, 2011.

PRADO-OCHOA, M. G.; GUTIÉRREZ-AMEZQUITA, R. A.; ABREGO-REYES, V. H.; VELÁZQUEZ-SÁNCHEZ, A. M.; MUÑOZ-GUZMÁN, M. A.; RAMÍREZ-NOGUERA, P.; ALBA-HURTADO, F. Assessment of Acute Oral and Dermal Toxicity of 2 Ethyl-Carbamates with Activity against *Rhipicephalus microplus* in Rats. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

QUEST, J. A.; CHAN, P. C.; CRAWFORD, D.; KANAGALINGAM, K. K.; HALL, W. C. Thirteen-week oral toxicity study of methyl carbamate in rats and mice. **Toxicological Sciences**, v. 8, n. 3, p. 389-399, 1987.

RAPINI, R.; MARRAZZA, G. Biosensor Potential in Pesticide Monitoring. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 74, p. 3-31, 2016.

ROBERTS J.R. & REIGART R. **Recognition and Management of Pesticide Poisonings**. 6. ed. United States Environmental Protection Agency. Washington. 2013.

ROSMAN, Y.; MAKAROVSKY, I.; BENTUR, Y.; SHROT, S.; DUSHNISTKY, T.; KRIVVOY, A. Carbamate poisoning: treatment recommendations in the setting of a mass casualties event. **The American journal of emergency medicine**, v. 27, n. 9, p. 1117-1124, 2009.

RUTKAUSKIS, J. R.; JACOMINI, D.; TEMPONI, L. G.; SARRAGIOTTO, M. H.; DA SILVA, E. A. A.; JORGE, T. C. M. Pediculicidal treatment using ethanol and *Melia azedarach* L. **Parasitology research**, v. 114, n. 6, p. 2085-2091, 2015.

SAHU, V. K.; RAGHUVVEER, I.; ALOK, S.; HIMANSHU, G. Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the ethanolic extract of whole plant extract of *Dendrophthoe falcata* (LF) Ettingsh. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research (IJPSR)**, v. 1, n. 1, p. 39-45, 2010.

SAMUDRAM P.; RAJESHWARI H.; VAKUSI R.; GEETHA A., SATHIYA MOORTHI P. Hepatoprotective activity of bi-herbal ethanolic extract on CCl₄ induced hepatic damage in rats. **Asian Journal Biochemical**, 3(5):308-314, 2008.

SCHVARTSMAN, S. **Intoxicações agudas**. 4. ed. São Paulo: Editora Sarvier. 269:270, 1991.

SHAO, X.; XIA, S.; DURKIN, K. A.; CASIDA, J. E. Insect nicotinic receptor interactions *in vivo* with neonicotinoid, organophosphorus, and methylcarbamate insecticides and a synergist. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 43, p. 17273-17277, 2013.

SHARMA, D. & PAUL, Y. Preliminary and Pharmacological Profile of *Melia azedarach* L.: An Overview. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** Vol, v. 3, n. 12, p. 133-138, 2013.

SILVA P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 131:252, 2010.

SULTANA, S.; AKHTAR, N.; ASIF, H. M. Phytochemical screening and antipyretic effects of hydro-methanol extract of *Melia azedarach* leaves in rabbits. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 8, n. 2, p. 214-217, 2013.

SUN, I. O.; YOON, H. J.; LEE, K. Y. Prognostic factors in cholinesterase inhibitor poisoning. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 21, p. 2900, 2015.

TAN, Q. G.; LI, X. N.; CHEN, H.; FENG, T.; CAI, X. H.; LUO, X. D. Sterols and terpenoids from *Melia azedarach*. **Journal of natural products**, v. 73, n. 4, p. 693-697, 2010.

VALE, A.; LOTTI, M. Organophosphorus and carbamate insecticide poisoning. **Handbook of clinical neurology**, v. 131, p. 149-168, 2015.

VAN DER WOUDE, H.; TER VELD, M. G.; JACOBS, N.; VAN DER SAAG, P. T.; MURK, A. J.; RIETJENS, I. M. The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor. **Molecular nutrition & food research**, v. 49, n. 8, p. 763-771, 2005.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, p. 390-400, 2003.

VINUTHA, B.; PRASHANTH, D.; SALMA, K.; SREEJA, S. L.; PRATITI, D.; PADMAJA, R.; DEEPAK, M. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 109, n. 2, p. 359-363, 2007.

WALL, M. E.; KRIDER, M. M.; KREWSON, C. F.; EDDY, C. R.; WILLAMAN, J. J.; CORELL, D. S.; GENTRY, H. S. Steroidal sapogenins. VII. Survey of plants for steroidal sapogenins and other constituents. **J. Am. Pharm. Assoc.**, 43(1): 1-7. 1954.

WANG, C. Y.; WU, C. L.; TSAN, Y. T.; HSU, J. Y.; HUNG, D. Z.; WANG, C. H. Early onset pneumonia in patients with cholinesterase inhibitor poisoning. **Respirology**, v. 15, n. 6, p. 961-968, 2010.

WESSELING, C.; KEIFER, M.; AHLBOM, A.; MCCONNELL, R.; MOON, J. D.; ROSENSTOCK, L.; HOGSTEDT, C. Long-term neurobehavioral effects of mild poisonings with organophosphate and n-methyl carbamate pesticides among banana workers. **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 8, n. 1, p. 27-34, 2002.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Acute Intoxication 2015**. Disponível em: <http://www.who.int/substance_abuse/terminology/acute_intox/en/>. Acesso em janeiro de 2015.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The prevention of mental disorders: effective interventions and policy options**. Geneva: WHO; 2004. Disponível em: <http://www.who.int/mental_health/evidence/en/prevention_of_mental_disorders_sr.pdf>. Acesso em 19 de maio de 2016.

WILLE, T.; KALTENBACH, L.; THIERMANN, H.; WOREK, F. Investigation of kinetic interactions between approved oximes and human acetylcholinesterase inhibited by pesticide carbamates. **Chemico-biological interactions**, v. 206, n. 3, p. 569-572, 2013.

XAVIER, F. G.; RIGHI, D. A.; SPINOSA, H. S. Aldicarb toxicology: general, clinic and therapeutic features in dogs and cats. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1206-1211, 2007.

XIAO, J.; ZHANG, Q.; GAO, Y. Q.; TANG, J. J.; ZHANG, A. L.; GAO, J. M. Secondary metabolites from the endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and their antifungal, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 16, p. 3584-3590, 2014.

YANOVSKY, I.; FINKIN-GRONER, E.; ZAIKIN, A.; LERMAN, L.; SHALOM, H.; ZEELI, S.; WEINSTOCK, M. Carbamate derivatives of indolines as cholinesterase inhibitors and antioxidants for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 23, p. 10700-10715, 2012.

ZHAO, L.; HUO, C.H.; SHEN, L.R.; YANG, Y.; ZHANG, Q. & SHI, Q.W. Chemical constituents of plants from the genus Melia. **Chemistry & biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 839-859, 2010.

ZHOU, Y.; WANG, S. & ZHANG, Y. Catalytic Reaction Mechanism of Acetylcholinesterase Determined by Born– Oppenheimer Ab Initio QM/MM Molecular Dynamics Simulations. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 26, p. 8817-8825, 2010.

7.2. Referências do Artigo Original

- [1] WHO - World Health Organization, "Acute Intoxication," 2015. [Online]. Available: http://www.who.int/substance_abuse/terminology/acute_intox/en/. [Accessed: 21-Jan-2017].
- [2] J. R. Roberts and R. Reigart, *Recognition and Management of Pesticide Poisonings*, 6th ed., vol. 1. Washington, 2013.
- [3] C. Wesseling, M. Keifer, A. Ahlbom, et al., "Long-term Neurobehavioral Effects of Mild Poisonings with Organophosphate and n-Methyl Carbamate Pesticides among Banana Workers," *Int. J. Occup. Environ. Health*, vol. 8, no. 1, pp. 27–34, 2002.
- [4] Y. Rosman, I. Makarovsky, Y. Bentur, et al., "Carbamate poisoning: treatment recommendations in the setting of a mass casualties event," *Am. J. Emerg. Med.*, vol. 27, no. 9, pp. 1117–1124, Nov. 2009.
- [5] J. E. Casida and K. A. Durkin, "Neuroactive Insecticides: Targets, Selectivity, Resistance, and Secondary Effects," *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 58, no. 1, pp. 99–117, 2013.
- [6] M. B. Colovic, D. Z. Krstic, T. D. Lazarevic-Pasti, A. M. Bondzic, and V. M. Vasic, "Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology," *Curr. Neuropharmacol.*, vol. 11, no. 3, pp. 315–335, Apr. 2013.
- [7] L. E. Alché, G. A. Ferek, M. Meo, C. E. Coto, and M. S. Maier, "An antiviral meliacarpin from leaves of *Melia azedarach* L.," *Zeitschrift fur Naturforschung. C*, vol. 58, no. 3–4, pp. 215–219, 2002.
- [8] P. Samudram, H. Rajeshwari, R. Vasuki, A. Geetha, and P. Sathiya Moorthi, "Hepatoprotective Activity of Bi-Herbal Ethanolic Extract on CCl₄ Induced Hepatic Damage in Rats," *Asian J. Biochem.*, vol. 3, no. 5, pp. 308–314, May 2008.
- [9] T. C. M. Jorge, V. Lenartovicz, M. W. Andrade, et al., "Pediculicidal activity of hydroethanolic extracts of *Ruta graveolens*, *Melia azedarach* and *Sambucus australis*," *Lat. Am. J. Pharm.*, vol. 28, no. 3, pp. 457–459, 2009.
- [10] J. R. Rutkauski, D. Jacomini, L. G. Temponi, et al., "Pediculicidal treatment using ethanol and *Melia azedarach* L.," *Parasitol. Res.*, vol. 114, no. 6, pp. 2085–2091, 2015.
- [11] P. Chaturvedi and M. Segale, "Effects of different types of water decoction of fruit *Melia azedarach* on glucose induced hyperglycemia, liver transaminases,

- lipid peroxidation and reduced glutathione in normal albino rats.," *Sci. Res. Essays*, vol. 2, no. 9, pp. 384–389, 2007.
- [12] M. Katalinić, G. Rusak, J. Domaćinović Barović, et al., "Structural aspects of flavonoids as inhibitors of human butyrylcholinesterase," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 1, pp. 186–192, Jan. 2010.
- [13] M. E. Wall, C. S. Fenske, J. J. Willaman, et al., "Steroidal sapogenins LX. Survey of plants for steroidal sapogenins and other constituents," *J. Am. Pharm. Assoc.*, vol. 43, no. 1, pp. 1–7, 1955.
- [14] C. Nath, M. K. Chakravorty, and S. R. Chowdhury, "Liebermann-Buchard Reaction for Steroids," *Nature*, vol. 157, pp. 103–104, 1946.
- [15] D. C. Michelin, S. M. Iha, D. Rinaldo, et al., "Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae)," *Brazilian J. Pharmacogn.*, vol. 15, no. 3, pp. 209–211, 2005.
- [16] V. K. Sahu, I. Raghuvver, S. Alok, and G. Himanshu, "Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the ethanolic extract of whole plant extract of *Dendrophthoe falcata* (L.F.) Ettingsh.," *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, vol. 1, no. 1, pp. 39–45, 2010.
- [17] J. M. Barbosa-Filho, T. H. C. Vasconcelos, A. A. Alencar, et al., "Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity," *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 15, no. 4, pp. 392–413, 2005.
- [18] C. B. Marek, A. M. Itinose, T. C. M. Jorge, et al., "Influence of leaf extracts from *Melia azedarach* L. on butyrylcholinesterase activity in rat liver," *J. Med. Plants Res.*, vol. 6, no. 22, pp. 3931–3938, Jun. 2012.
- [19] C. Latoud, F. Peypoux, G. Michel, R. Genet, and J. L. Morgat, "Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 856, pp. 526–535, Apr. 1986.
- [20] B. . Meyer, N. R. Ferrigni, J. E. Putnam, et al., "Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents," *Planta Med.*, vol. 45, no. 5, pp. 31–34, May 1982.
- [21] G. L. Ellman, K. D. Courtney, J. Valentino Andres, and R. M. Featherstone, "A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 7, pp. 88–95, 1961.
- [22] NTP - National Toxicology Program, "Toxicology and Carcinogenesis Studies of Methyl Carbamate," *Technical Rep. Ser.*, no. 328, 1987.
- [23] E. Carstens and G. P. Moberg, "Recognizing pain and distress in laboratory

- animals," *ILAR J.*, vol. 41, no. 2, pp. 62–71, 2000.
- [24] J. A. Quest, P. C. Chan, D. Crawford, K. K. Kanagalingam, and W. C. Hall, "Thirteen-week oral toxicity study of methyl carbamate in rats and mice," *Toxicol. Sci.*, vol. 8, no. n, pp. 389–399, 1987.
- [25] M. G. Prado-Ochoa, R. A. Gutiérrez-Amezquita, V. H. Abrego-Reyes, et al., "Assessment of Acute Oral and Dermal Toxicity of 2 Ethyl-Carbamates with Activity against *Rhipicephalus microplus* in Rats," *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–10, 2014.
- [26] P. G. Harms and S. R. Ojeda, "A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein.," *J. Appl. Physiol.*, vol. 36, no. 3, pp. 391–392, Mar. 1974.
- [27] A. M. Reichert, C. B. Marek, A. M. Itinose, et al., "Biochemical alterations induced by phytotherapeutic tincture with antiophidic activity in male Wistar rats," *African J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 8, no. 28, pp. 737–746, Jul. 2014.
- [28] G. Cimasoni, "Inhibition of cholinesterases by fluoride *in vitro.*," *Biochem. J.*, vol. 99, no. 1, pp. 133–137, Apr. 1966.
- [29] O. H. Lowry, N. J. Rosebrought, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent," *J Bio Chem*, vol. 193, no. 1, pp. 265–275, May 1951.
- [30] T. J. Lopes, M. F. Xavier, M. G. N. Quadri, and M. B. Quadri, "Antocianinas: Uma Breve Revisão das Características Estruturais e da Estabilidade," *R. Bras. Agrociência*, vol. 13, no. 3, pp. 291–297, 2007.
- [31] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. KRIZ, and J. R. Vyvyan, *Introdução à espectroscopia*. São Paulo, 2010.
- [32] W. C. Dornas, T. T. Oliveira, R. G. Rodrigues das Dores, A. F. Santos, and T. J. Nagem, "Flavonóides: Potencial Terapêutico no Estresse Oxidativo," *Rev. Ciências Farm. Básica e Apl.*, vol. 28, no. 3, pp. 241–249, 2007.
- [33] A. Lucić, V. Bradamante, B. Radić, et al., "The effect of dichlorvos treatment on butyrylcholinesterase activity and lipid metabolism in rats.," *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, vol. 53, no. 4, pp. 275–282, Dec. 2002.
- [34] C. Cortinovis and F. Caloni, "Epidemiology of intoxication of domestic animals by plants in Europe," *Vet. J.*, vol. 197, no. 2, pp. 163–168, Aug. 2013.
- [35] D. Sharma and Y. P. Singla Dr., "Preliminary and pharmacological profile of *Melia azedarach* L.: An overview," *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 3, no. 12, pp. 133–138, 2013.

- [36] C. R. Wilson, J. M. Sauer, and S. B. Hooser, "Taxines: A review of the mechanism and toxicity of yew (*Taxus spp.*) alkaloids," *Toxicon*, vol. 39, no. 2–3, pp. 175–185, 2001.
- [37] J. M. Monteiro, U. P. de Albuquerque, E. D. L. Araujo, and E. L. C. de Amorim, "Tannins: From chemistry to ecology," *Quim. Nova*, vol. 28, no. 5, pp. 892–896, 2005.
- [38] H. Matsuura and A. G. Fett-Neto, *Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action*, no. july. Dordrecht, 2015.
- [39] M. T. S. Trevisan, M. Z. B. Bezerra, G. M. P. Santiago, et al., "Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*," *Quim. Nova*, vol. 29, no. 3, pp. 415–418, Jun. 2006.
- [40] H. van der Woude, M. G. R. ter Veld, N. Jacobs, et al., "The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 49, no. 8, pp. 763–771, Aug. 2005.
- [41] X. Shao, S. Xia, K. A. Durkin, and J. E. Casida, "Insect nicotinic receptor interactions *in vivo* with neonicotinoid, organophosphorus, and methylcarbamate insecticides and a synergist," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 43, pp. 17273–17277, 2013.
- [42] I. Uriarte-Pueyo and M. I. Calvo, "Flavonoids as Acetylcholinesterase Inhibitors," *Curr. Med. Chem.*, vol. 18, no. 34, pp. 5289–5302, Dec. 2011.
- [43] J. Massoulié, J. Sussman, S. Bon, and I. Silman, "Structure and functions of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase," *Prog. Brain Res.*, vol. 98, pp. 139–146, 1993.
- [44] A. N. Çokuğraş, "Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance," *Turkish J. Biochem.*, vol. 28, no. 2, pp. 54–61, 2003.
- [45] L. Santarpia, I. Grandone, F. Contaldo, and F. Pasanisi, "Butyrylcholinesterase as a prognostic marker: a review of the literature," *J. Cachexia. Sarcopenia Muscle*, vol. 4, no. 1, pp. 31–39, Mar. 2013.

8. ANEXO I

Protocolos aprovados pelo comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CEUA/UNIOESTE)



unioeste

Universidade Estadual do Oeste de Paraná

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Desenvolvimento de um modelo experimental de rato intoxicado de forma aguda por via oral com metil carbamato", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 11/09/2015

Prof. Dra. Luciana Oliveira de Fariña

Coordenadora do CEUA

Portaria nº 2729/2014 - GRE

**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

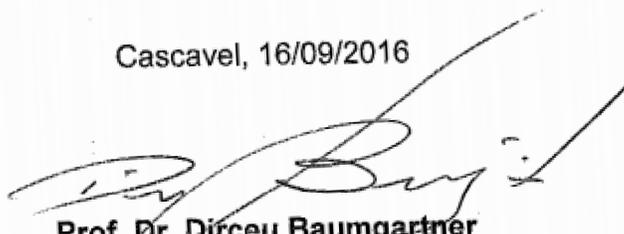
PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Efeito do extrato de *Melia azedarach* L sobre o sistema colinérgico em ratos envenenados com metilcarbamato", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 16/09/2016



Prof. Dr. Dirceu Baumgartner
Coordenador Suplente do CEUA
Portaria nº 3730/2016 - GRE

9. ANEXO II

Normas da Revista Científica: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine



Author Guidelines

Language editing

Hindawi has partnered with Editage to provide an English-language editing service to authors prior to submission. Authors that wish to use this service will receive a 10% discount on all editing services provided by Editage. To find out more information or get a quote, please [click here](#).

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online [Manuscript Tracking System](#). Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact ecam@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All inquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to ecam@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. If approved by the editor, submissions will be considered by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, please visit the [Article Processing Charges](#) information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

Paper title

Full author names

Full institutional mailing addresses

Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interest in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interest, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.”