



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

DELVA THYARES FONSECA DO NASCIMENTO PEREIRA DA SILVA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA AZADIRACHTA INDICA EM RATOS

**AREIA
2022**

DELVA THYARES FONSECA DO NASCIMENTO PEREIRA DA SILVA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA AZADIRACHTA INDICA EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra

Coorientadora: Prof. Dra. Fabíola Fialho Furtado

**AREIA
2022**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S586a Silva, Delva Thyares Fonseca do Nascimento
Pereira da.

Avaliação da toxicidade aguda da Azadirachta indica
em ratos / Delva Thyares Fonseca do Nascimento Pereira
da Silva. - Areia:UFPB/CCA, 2022.
53 f.

Orientação: Ricardo Romão Guerra.
Coorientação: Fabíola Fialho Furtado.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Ciência Animal. 2. Azadirachta indica. 3. Extrato
de neem. 4. Plantas tóxicas. I. Guerra, Ricardo Romão.
II. Furtado, Fabíola Fialho. III. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 636.09(043.3)



**DELVA THYARES FONSECA DO NASCIMENTO PEREIRA DA
SILVA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA AZADIRACHTA INDICA EM
RATOS**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
Concentração Saúde Animal no Brejo
Paraibano.

APROVADA EM 27/07/2022

BANCA EXAMINADORA

Dr. RICARDO ROMÃO GUERRA
UFPB
Orientador

Dr. HUGO ENRIQUE MÉNDEZ GARCIA
UFPB
Examinador

Dr. RICARDO BARBOSA DE LUCENA
UFPB
Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DELVA THYARES FONSECA DO NASCIMENTO PEREIRA DA SILVA - Nascida em 17 de abril de 1997, no município de Recife, estado de Pernambuco. Ingressou no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas na Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Campus I, em 2014. Em novembro de 2018, obteve o título de Licenciada em Ciências Biológicas, pela Universidade Federal da Paraíba – UFPB. Em sua trajetória acadêmica realizou trabalhos nos Laboratórios de Prática e Processamento Histopatológico - UPPB e Processamento de Amostras Biológicas e Histotecnologia (LAPABH) da Escola Técnica de Saúde da UFPB. Foi monitora da Disciplina Biologia do Desenvolvimento Humano por dois períodos letivos, participou ativamente de projetos de pesquisa e extensão, com ênfase em técnica em histologia e estratégias educativas de prevenção e combate ao mosquito *Aedes aegypti*. Iniciou o curso de mestrado em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCAn) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus II – Areia-PB, em março de 2020, sob orientação do Prof. Ricardo Romão Guerra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, me guiando até aqui.

A minha mãe, maior incentivadora e inspiração.

Ao meu esposo, Arnaldo Lamec pelo incentivo, força e amor dedicado, por compreender minhas ausências nesse período tão árduo, por todo apoio, consolo e afago, obrigada.

Agradeço também aos meus amigos e familiares que me ajudaram e me deram suporte nessa jornada, que por mais difíceis que fossem as circunstâncias, sempre estiveram comigo, em especial meu irmão Hugo Thyares, por toda ajuda e participação significativa em minha pesquisa.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra por todas as contribuições. A minha coorientadora e amiga, Prof. Dra. Fabíola Fialho Furtado pelo estímulo, apoio e amparo que ultrapassaram o âmbito acadêmico. E ao professor Hugo Enrique, por todo auxílio durante a realização da minha pesquisa.

Aos professores do Curso, em especial, ao Prof. Dr. Fernando Nogueira e Prof. Dra. Danila Campos, que tanto contribuíram ao longo desses semestres mesmo diante aos desafios impostos, resultantes de uma pandemia.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Hugo Enrique Méndez Garcia e Prof. Ricardo Barbosa de Lucena, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro e a coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na pessoa de Jozenio Souza, por toda paciência e presteza no atendimento quando nos foi necessário, atendendo prontamente a todas as dúvidas e solicitações.

Ao meu filhinho de quatro patas, que sempre quando eu estava triste me alegrou (mesmo sem dizer uma palavra) com todo o seu amor.

Por fim, sou grata a todos que me ajudaram de maneira direta ou indiretamente a trilhar esse caminho.

Meu muito obrigada!

“É preciso suportar duas ou três lagartas se quiser conhecer as borboletas.”
Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

A *Azadirachta indica* é uma espécie pertencente à família Meliaceae, foi introduzida no Brasil em 1984, e encontra-se hoje em quase todas as regiões do país. Possui várias atividades já descritas na literatura, entre elas destaca-se a atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e hepatoprotetora, além do seu potencial tóxico para insetos, o que torna sua utilização como pesticida amplamente difundida. Porém há poucos estudos que comprovem seu grau de toxicidade para animais vertebrados. Por esta razão, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o perfil toxicológico do extrato aquoso de *Azadirachta indica* na dose de 2.000 mg/kg. Para isso, 16 *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar machos foram distribuídos em dois grupos experimentais: grupo tratado e grupo controle. Ao grupo controle foi administrado o veículo de diluição do extrato, a água. Já o grupo tratado, foi submetido à dose única de 2000mg/kg do extrato aquoso de *Azadirachta indica*, por via oral. Após o período experimental, foram realizadas análises hematológicas, bioquímicas, análise comportamental, avaliação de peso, mortalidade, ingestão de água e ração, como também avaliação histopatológica dos rins e fígado. Os resultados não mostraram alterações nos parâmetros comportamentais, de mortalidade, ganho de peso, nem diferenças quanto ao consumo. Já as análises sanguíneas apresentaram aumento em hemoglobina, leucócitos, AST, ALT, FA e creatinina. Através das análises histopatológicas detectou-se alterações significativas no fígado que apresentou vacuolização nos hepatócitos e nos rins com acentuada congestão dos vasos sanguíneos do interstício renal. Portanto, conclui-se que o extrato aquoso de *A. indica* apresentou alterações sugerindo nefrotoxicidade e hepatotoxicidade quando administrado por via oral na dose de 2.000 mg/kg.

Palavras-Chave: extrato de neem; plantas tóxicas; *Azadirachta indica*.

ABSTRACT

Azadirachta indica is a species belonging to the Meliaceae family, was introduced in Brazil in 1984, and is now found in almost all regions of the country. It has several activities already described in the literature, among them the antibacterial, antifungal, anti-inflammatory and hepatoprotective activity, in addition to its toxic potential for insects, which makes its use as a pesticide widely spread. However, there are few studies that prove its degree of toxicity for vertebrate animals. For this reason, the present work aims to evaluate the toxicological profile of the aqueous extract of *Azadirachta indica* at a dose of 2.000 mg/kg. For this, 16 *Rattus norvegicus*, male Wistar strains were distributed in two experimental groups: treated group and control group. The control group was administered the extract dilution vehicle, water. The treated group was submitted to a single dose of 2000mg/kg of aqueous extract of *Azadirachta indica*, orally. After the experimental period, hematological, biochemical, behavioral analysis, weight assessment, mortality, water and food intake, as well as histopathological assessment of the kidneys and liver were performed. The results showed no changes in behavioral parameters, mortality, weight gain, or differences in consumption. Blood tests showed an increase in hemoglobin, leukocytes, AST, ALT, FA and creatinine. Through histopathological analysis, significant changes were detected in the liver, which showed vacuolization in hepatocytes and in the kidneys with marked congestion of blood vessels in the renal interstitium. Therefore, it is concluded that the aqueous extract of *A. indica* showed alterations suggesting nephrotoxicity and hepatotoxicity when administered orally at a dose of 2.000 mg/kg.

Keywords: neem extract; toxic plants; *Azadirachta indica*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1	Parâmetros avaliados no estudo de toxicidade aguda.....	18
Figura 2	Distribuição Geográfica da <i>Azadirachta indica</i> no mundo.....	20
Figura 3	A Árvore do Neem.	21
Figura 4	Partes da árvore do Neem.....	21
Figura 5	Estruturas da Azadiractina de <i>Azadirachta indica</i> (família Meliaceae).....	22

CAPÍTULO II

Figura 1	Gráfico de dispersão da variação de peso dos ratos Wistar dos grupos controle e tratado com extrato aquoso de <i>Azadirachta indica</i> (2.000 mg/kg).....	40
Figura 2	Fotomicrografias dos cortes histológicos de fígado de ratos Wistar machos, dos grupos controle (água) e tratado com o extrato aquoso de <i>Azadirachta indica</i> (2.000 mg/kg).	48
Figura 3	Fotomicrografias dos cortes histológicos de rim de ratos Wistar machos, dos grupos controle (água) e tratado com o extrato aquoso de <i>Azadirachta indica</i> (2.000 mg/kg).	49

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1	Classificação taxonômica do Neem (<i>Azadirachta indica</i>).....	20
Tabela 2	Utilizações e Indicações do Neem.....	26

CAPÍTULO II

Tabela 1	Consumo médio de ração e água dos ratos Wistar machos, dos grupos controle e tratado com extrato aquoso de <i>Azadirachta indica</i> (2.000 mg/kg).....	41
Tabela 2	Parâmetros hematológicos de ratos Wistar machos, dos grupos controle (água) e tratado com extrato aquoso de <i>Azadirachta indica</i> (2.000 mg/kg).....	43
Tabela 3	Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratos Wistar machos, dos grupos controle (água) e tratado com extrato aquoso de <i>Azadirachta indica</i> (2.000 mg/kg).....	45
Tabela 4	Peso de órgãos de ratos Wistar machos, dos grupos controle e tratado com extrato aquoso de <i>Azadirachta indica</i> (2.000 mg/kg), após 14 dias do experimento.....	47
Tabela 5	Análise histopatológica dos cortes de fígado e rim de ratos Wistar, dos grupos controle (água) e tratado com extrato aquoso de <i>Azadirachta indica</i> (2.000 mg/kg).	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
mg	Miligrama
kg	Quilograma
N- LAB	Laboratório Veterinário de Análises Clínicas Natanel Filho
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
LAPABH	Laboratório de Processamento de Amostras Biológicas e Histotecnologia

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca Registrada
mm ³	Milímetro cúbico
dL	Decilitro
ml	Mililitros
L	Litro
UI	Unidade Internacional

SUMÁRIO

1.	CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	14
2.	CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	O USO DE FITOTERÁPICOS	15
2.2	ESTUDO DE TOXICIDADE.....	15
2.3	MELIACEAE.....	16
2.4	<i>Azadirachta indica</i>	16
2.5	UTILIZAÇÃO E INDICAÇÕES	16
2.5.1	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	23
2.5.2	PROPRIEDADES CICATRIZANTE.....	23
2.5.3	UTILIZAÇÃO NA SAÚDE BUCAL.....	23
2.5.4	AÇÃO ANTIVIRAL E ANTIMICROBIANA.....	24
2.5.5	EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO.....	24
2.5.6	AÇÃO INSETICIDA.....	24
2.5.7	POTENCIAL ANTIFERTILIDADE.....	25
2.5.8	EFEITO ANTIDIABÉTICO.....	25
	REFERÊNCIAS.....	27
3.	CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA AZADIRACHTA INDICA EM RATOS.....	34
3.1	RESUMO.....	34
3.2	ABSTRACT.....	34
3.3	INTRODUÇÃO	35
3.4	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
3.6	CONCLUSÃO.....	50
4.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
	REFERÊNCIAS	50

1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Diversas espécies vegetais possuem, em um ou mais de seus órgãos, substâncias que podem ser usadas para fins terapêuticos. Por tal motivo, as plantas têm desempenhado um importante papel no tratamento de diferentes doenças. (DOUGHARI, 2012).

A *Azadirachta indica* (Neem) é uma planta pertencente à ordem dos Rutales, subordem Rutinaea, família Meliaceae, subfamília Mlioideae, gênero *Azadirachta*. É uma árvore milenar, nativa da Índia, introduzida no Brasil em 1984, e encontra-se hoje em quase todas as regiões do país (GUMIERO, 2008). Adapta-se bem a solos de baixa fertilidade, baixos teores de fósforo, cálcio, magnésio, potássio e zinco, de matéria orgânica (FORIM, 2006).

A *Azadirachta indica* é conhecida por seu amplo espectro de compostos com interesse biológico e farmacológico. Estes incluem, atividades antibacterianas, antivirais, antioxidante, anti-inflamatórias, cicatrizantes e alguns compostos de neem também são usados como inseticidas, herbicidas (FERNANDES, 2014; NAIK, 2014; SINGH, 2014; FIGUEIREDO et al., 2002; SILVA, 2020).

Embora várias partes do neem tenham um uso extensivo em sistemas tradicionais da medicina, a mensuração da toxicidade de seus compostos naturais é crucial antes de sua aplicação como droga terapêutica (PATEL, 2016). Para tanto, é imprescindível realizar as análises bioquímicas, como também caracterizar as possíveis alterações histopatológicas, objetivando proporcionar uma maior segurança em sua utilização no tratamento em animais.

2 CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O USO DE FITOTERÁPICOS

Há milhares de anos, o homem vem utilizando os recursos da flora no tratamento de diversas patologias. Encontram-se diversos relatos da utilização de plantas com finalidades terapêuticas desde a antiguidade, a exemplo da obra *Pen Ts'ao* do chinês Shen Nung, datada por volta de 3.000 a.C (TYLER, 1996).

Foi através da observação e da experimentação pelos povos primitivos que as propriedades terapêuticas de determinadas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração, fazendo parte da cultura popular. Mesmo com o desenvolvimento de indústrias farmacêuticas e dos fármacos sintéticos, as plantas medicinais permaneceram como forma alternativa de tratamento em várias partes do mundo (TUROLLA, 2006).

Fatores como a riqueza de espécies vegetais e biomas no Brasil, o fácil acesso à diversidade de plantas e a compatibilidade cultural são de extrema relevância para o progresso no uso dos medicamentos fitoterápicos, implicando na ampla utilização de plantas com fins terapêuticos, conferindo assim um excelente custo-benefício para tal prática (PEREIRA, 2015).

O levantamento do uso de plantas no tratamento de enfermidades permite conhecer as suas propriedades terapêuticas e as reações tóxicas associadas ao consumo inadequado e/ou exagerado (AMOROZO, 2002; SILVA et al., 2014). O reconhecimento da importância de plantas para o desenvolvimento de fármacos modernos e com proposta terapêutica de maior eficácia, foi oficializado através do lançamento da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com abrangência nacional, e aprovada por meio do Decreto Nº 5.813 em 22 de junho de 2006, o qual estabelece diretrizes para o desenvolvimento de ações voltadas à garantia ao acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2006).

Apesar da sua eficácia comprovada e baixo custo operacional, a fitoterapia não apresenta aplicação uniforme em todo o país, além de ser um tema muitas vezes desconhecido pelos profissionais de saúde. As dificuldades surgem já no entendimento correto da diferença entre medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais, cujos conceitos são confundidos tanto pela população quanto pelos profissionais (ESTEVES, 2020).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as plantas medicinais são aquelas utilizadas pela população com finalidade terapêutica, cuja eficácia vem sendo comprovada por estudos químicos e farmacológicos. Já os medicamentos fitoterápicos

são obtidos pela extração de matérias-primas vegetais ativas, que passam por processo de industrialização e apresentam eficácia baseada em evidências clínicas (BRASIL, 2010).

Na medicina veterinária, tornou-se comum a utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades, principalmente na zona rural. E a utilização desses produtos naturais vem tornando-se cada vez mais ampla e tem conquistado espaço e interesse na indústria farmacêutica, como fontes estimulantes para novas moléculas com propriedades farmacológicas e químicas únicas (NABI et al., 2013; CABRAL, 2020).

No entanto, sabe-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações adversas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes presentes nas preparações (TUROLLA, 2006). Evidenciando cada vez mais a importância de estudos de toxicidade, assim como um rigoroso controle de qualidade desde o cultivo, coleta da planta, extração dos seus constituintes, até a elaboração do medicamento final.

2.2 ESTUDO DE TOXICIDADE

Os estudos de toxicidade são utilizados para investigar o perfil de segurança do composto estudado, como também fornecem informações importantes sobre a absorção, distribuição, metabolismo e excreção (DIAS, 2015).

Em plantas medicinais, o estudo de toxicidade é extremamente necessário, visto que estas não estão isentas dos efeitos tóxicos e indesejáveis. A maioria das plantas consumidas no Brasil apresentam pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, tornando arriscado o uso desses compostos, já que podem conter substâncias tóxicas ao organismo (CASTRO, 2006).

A toxicidade das plantas medicinais é um problema de saúde pública, visto que há escassez de pesquisas e fragilidade nas normas brasileiras para o comércio destes produtos (VEIGA, 2005). Diversos fatores influenciam na toxicidade da planta, como sua contaminação por microrganismos, pesticidas, contaminação por metais pesados, a estação do ano que foi colhida, diferentes processos de extração e até mesmo identificação botânica errônea, além de possuírem um potencial na produção de metabólitos secundários que pela inalação, ingestão ou contato podem causar alterações patológicas em humanos e animais e, em alguns casos, pode levar a sérios distúrbios no organismo e até mesmo o óbito (LIMA, 2009).

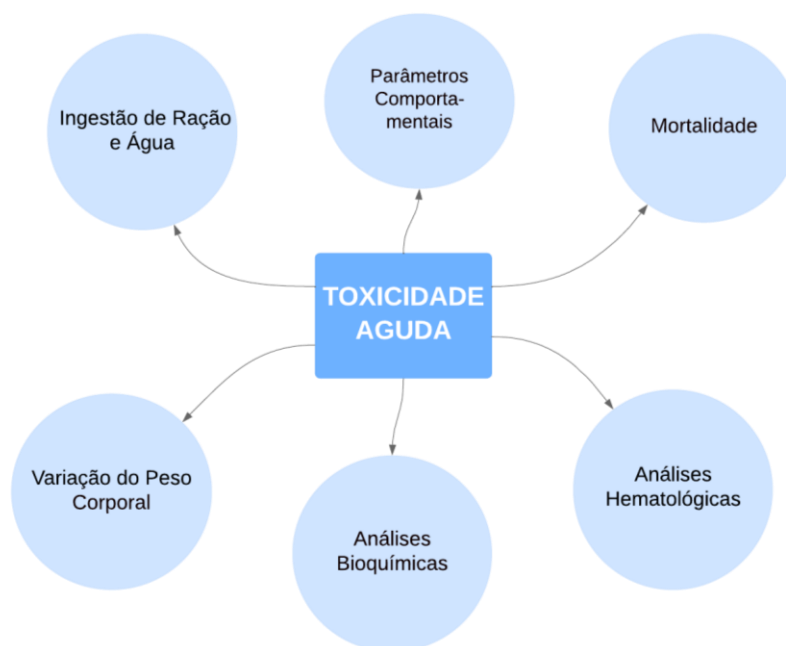
A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada através do Decreto nº 5.813 em 22 de junho de 2006, apresenta nas suas diretrizes o incentivo ao desenvolvimento e à pesquisa no que se refere ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos que possam ser disponibilizados com eficácia, segurança e qualidade à população, dando prioridade à biodiversidade do país (BRASIL, 2006; CARVALHO et al., 2007). Uma vez implementada a política, tornam-se necessários estudos toxicológicos pré-clínicos para oferecer aos pesquisadores segurança em relação às doses em que aparecem efeitos tóxicos em animais de laboratório (CASTRO, 2006).

A avaliação da toxicidade é realizada com a finalidade de determinar o potencial de substâncias em causar danos frente ao organismo. Através de alguns testes, é possível avaliar e classificar substâncias conforme a letalidade ou toxicidade, além de evidenciar o potencial tóxico em órgãos específicos (NUNES, 2015).

Em 2010, a ANVISA lançou um guia para orientação de estudos não clínicos de segurança durante o desenvolvimento de medicamentos. No guia, estão incluídos estudos de toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas (também denominada dose subaguda) reprodutiva, genotoxicidade, tolerância local e outros estudos de interesse na avaliação da segurança farmacológica e toxicocinética (BRASIL, 2010).

De acordo com VALADARES (2006), a toxicidade aguda é aquela em que os efeitos tóxicos em animais são produzidos a partir de uma dose única ou múltiplas doses do agente tóxico em um período de 24h. A observação dos efeitos se dá até 14 dias após administração do agente tóxico. São avaliados: parâmetros comportamentais, mortalidade, variações de peso corporal e ingestão de ração, análises hematológicas e bioquímicas (Figura 1).

Figura 1: Parâmetros avaliados no estudo de toxicidade aguda.



Fonte: SILVA, 2022.

Segundo o Guia da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD 423), as doses fixas administradas devem estar entre 5 e 2000 mg/kg/dia, por via oral (v.o), e devem ser utilizados 3 animais por dose. Nesse caso, não é exigido o cálculo da DL50, já que o método possui grande precisão estatística. (BRASIL, 2010)

Os ensaios de toxicidade subaguda ou também denominados doses repetidas, podem durar de 28 a 90 dias, estabelecem-se níveis aos quais não são observados efeitos tóxicos, identificam-se e caracterizam-se órgãos afetados, severidade após exposição repetida e reversão dos efeitos tóxicos (OGA; CAMARGO; BASTIUZZO, 2008). Normalmente são utilizadas três doses, onde a mais alta é eleita com a expectativa de produzir efeitos observáveis, porém não pode acarretar morte ou sofrimento (BRASIL, 2010).

2.3 MELIACEAE

A família Meliaceae é composta por árvores e arbustos, suas folhas são compostas, alternas, pinadas, sem estípulas e às vezes com pulvinos na base. As flores são bissexuadas, possuem estaminódios e pistilódios bem desenvolvidos. Os frutos são cápsulas loculicidas, septífragas ou raramente drupas (STEFANO,2015).

Uma característica de destaque encontrada na maioria das meliáceas, é o tubo floral desenvolvido, que ocorreu de forma adaptativa, e é formado pela conexão dos filamentos. As adaptações ampliam-se nos modos de dispersão de sementes e de polinização. Abelhas e mariposas são os principais polinizadores das pequenas flores nectaríferas de Meliaceae (FLORES,2020).

A família Meliaceae representa cerca de 550 espécies em 50 gêneros. Gêneros com drupas ou cápsulas e/ou sementes coloridas são dispersas por aves e mamíferos (incluindo morcegos). Sementes aladas (como em *Swietenia* e *Cedrela*) são dispersas pelo vento. A reprodução ocorre sexuadamente, nas plantas dióicas e monóicas, onde a união do grão de pólen (célula masculina) ao óvulo (célula feminina) dará origem à semente. A polinização cruzada é promovida pela presença de flores unissexuais com a ajuda de agentes polinizadores. (FLORES,2020).

Entre as espécies arbóreas estão algumas de valor econômico. Dentre estas, algumas espécies merecem destaque por produzirem madeira de boa qualidade, valorizada na fabricação de móveis, instrumentos musicais, acabamentos de interiores e construções navais, como o mogno (*Swietenia macrophylla*) e o cedro-branco (*Cedrela fissilis*). Outra espécie bem importante é a árvore neem (*Azadirachta indica*), que produz uma resina antisséptica usada medicinalmente e na produção de pasta de dente, sabonetes e loções (MUELLNER et al., 2003).

2.4. *Azadirachta indica*

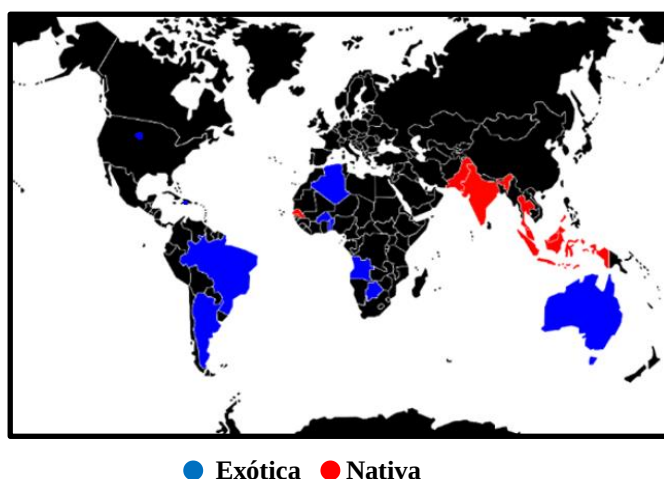
A *Azadirachta indica* é uma planta que pertence à ordem dos Rutales, subordem Rutinaea, família Meliaceae, subfamília Melioideae, gênero *Azadirachta* e espécie *Azadirachta indica* (Tabela 1). É uma árvore milenar, nativa da Índia e possui vários nomes comuns em todo o mundo: na Índia pode ser chamada neem, nim, limba; na Austrália neem; nos Estados Unidos neem; na África nim, babo, yaro e marrango; em Portugal nim e margosa; e no Brasil nim ou neem (UCHEGBU, 2011).

Tabela 1: Classificação taxonômica do Neem (*Azadirachta indica*).

Classificação Taxonômica do Neem	
Ordem	Rutales
Subordem	Rutinaea
Família	Meliaceae
Subfamília	Melioideae
Gênero	Azadirachta
Espécie	<i>Azadirachta indica</i>

Fonte: UCHEGBU, 2011.

No Brasil a espécie foi introduzida em 1984, e encontra-se hoje em quase todas as regiões do país (GUMIERO, 2008). Adapta-se bem a solos de baixa fertilidade como os solos de cerrado que apresentam pH ácidos, baixos teores de fósforo, cálcio, magnésio, potássio e zinco, baixos teores de matéria orgânica e baixa capacidade de troca catiônica (FORIM, 2006). A figura 2 mostra a distribuição geográfica das áreas naturais e plantadas de neem no mundo.

Figura 2: Distribuição Geográfica da *Azadirachta indica* no mundo.

● Exótica ● Nativa

Fonte: OLIVEIRA, 2019.

Cresce bem em áreas de clima tropical e subtropical, o porte da árvore (Figura 3) pode variar de 15 a 20 m de altura, com tronco semireto de 30 a 80 cm de diâmetro, relativamente curto e duro, com coloração marrom avermelhada. O diâmetro da copa varia de 8 a 12 m podendo atingir 15 m em árvores isoladas (MOSSINI, 2005).

Figura 3: Árvore da *Azadirachta indica* (Neem).



Fonte: Digital Herbarium of Crop Plants.
Acesso em: 09/02/2022

A *Azadirachta* possui folhas verdes durante todo o ano, as mesmas são alternadas, glabras (sem pelos) e de consistência membranácea, com bordos irregulares, sendo usualmente empregadas no controle de pragas, a exemplo da mosca branca (*Bemisia tabaci*), mosca minadora (*Liomyza sativae*), traça das crucíferas (*Plutella xylostela*) e lagartas em geral. Seus frutos (Figura 4) são lisos, elipsóides, com 1,5 por 2 cm de comprimento de cor amarelada com uma polpa doce envolvendo as sementes, que são compostas por uma casca e um ou mais caroços (IAC, 2021).

As flores da *Azadirachta* (Figura 4) são numerosas e pequenas, de coloração branca ou de cor creme e reunidas em inflorescências densas, de cerca de 25 cm de comprimento, encontrando-se tanto flores masculinas como hermafroditas na mesma planta (IAC, 2021). Já as raízes penetram profundamente no solo, o que lhe proporciona uma melhor absorção de nutrientes, proporcionando um melhor desenvolvimento.

Figura 4: Partes da árvore do Neem: **A:** Frutos, **B:** Folhas e **C:** Flores

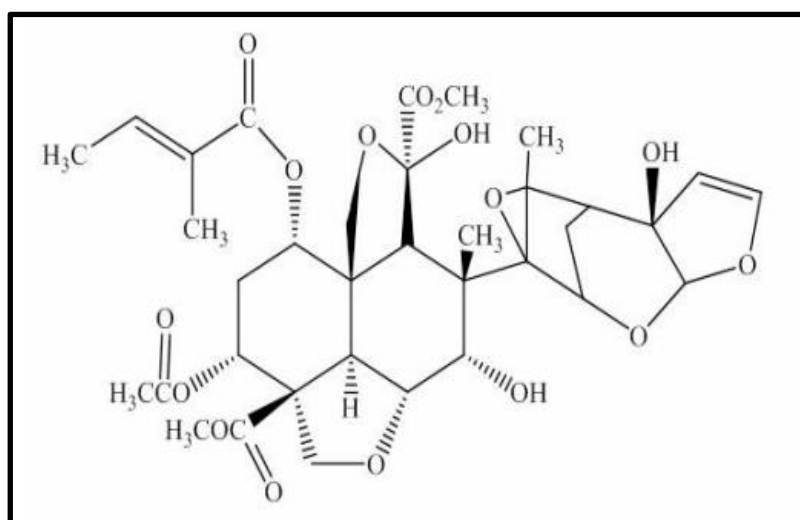


Fonte: Digital Herbarium of Crop Plants.
Acesso em: 09/02/2022

O neem possui capacidade de produzir uma expressiva variedade de compostos bioativos que promovem proteção contra diversas pragas. Esses compostos, de forma geral, pertencem à classe dos produtos naturais conhecidos por triterpenos, mais especificamente limonóides (MACIEL et al., 2010). Os limonóides são os maiores representantes da classe dos terpenos com atividade inseticida, sendo conhecidos como meliacinas por ter o sabor amargo (RIBEIRO et al., 2008).

Diferentes fitoquímicos como quercetina, azadiractina, nimbina, nimbinina e nimbidina foram purificados das diferentes partes da planta, sendo a Azadiractina (Figura 5) o principal princípio ativo encontrado no neem (RAHMANI,2018). Todos esses constituintes foram relatados não tendo somente uma complexidade química, como também uma atividade biológica comprovada (BITTENCOURT, 2006; SCHUMACHER, 2011).

Figura 5: Estruturas da Azadiractina de *Azadirachta indica* (família Meliaceae)



Fonte: GANGADHARA et al. (2009).

2.5 UTILIZAÇÃO E INDICAÇÕES

A madeira do neem é bastante utilizada para a construção de ferramentas, brinquedos e até mesmo estátuas religiosas em algumas partes da Índia (BITTENCOURT,2009). Devido a sua resistência ao ataque de insetos, pode ser utilizada como postes de rede elétrica, palanques para cerca, vigas para construção civil e na fabricação de móveis (SAXENA, 2001). Também pode ser utilizado na fabricação de xampus, condicionadores, óleo para cabelos, tônico capilar e unha, sabonetes, pasta dental e filtro solar (BITTENCOURT,2009; CPT, 2021; OSI, 2021).

É utilizada no setor madeireiro para fabricação de móveis, mourões, estacas, esteios, ripas, caibros e utensílios domésticos, pois sua madeira é bastante resistente a cupins devido às suas propriedades inseticidas. Também é muito utilizada para arborização em praças e ruas. No campo, utiliza-se como quebra-vento e para sombreamento (FONTENELE, et al. 2020). Adicionalmente, possui importância na produção de produtos químicos e industriais, podendo ser fonte de renda para agricultores que residem em pequenas propriedades.

O neem indiano poderá tornar-se um dos principais insumos no cultivo de produtos orgânicos, pois possui enorme potencial para auxiliar pequenos e médios produtores a obter uma fonte de renda alternativa, assim como proporciona uma diversidade de utilização e benefícios (BITTENCOURT, 2009). A *Azadirachta indica* pode ser indicada para fins medicinais desde a raiz até a sua copa. Para tanto, utiliza-se diferentes partes da planta: folha, casca, raiz, semente e flores, as quais já demonstraram importantes atividades biológicas (RAHMANI, 2018).

2.5.1 Atividade Antioxidante

SITHISARN, et al. (2005) avaliou a atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas e do extrato etanólico das flores e cascas do caule. Neste estudo, os extratos demonstraram alta atividade antioxidante. GUIMERAY, et al. (2009) em estudo comparativo, observou que a casca possuía conteúdos fenólicos mais complexos do que as folhas, tendo assim, maior atividade antioxidante.

2.5.2 Propriedades Cicatrizante

As propriedades cicatrizantes das folhas de neem são conhecidas desde os tempos antigos. SINGH (2014) avaliou os efeitos do óleo de neem no tratamento de feridas crônicas que não cicatrizavam, após 8 semanas de tratamento, 50% de cicatrização de feridas foi observada em quase 44% dos pacientes. CHUNDRAN (2015), também utilizou o extrato aquoso de folhas de neem para verificar as atividades de cicatrização de feridas, e uma redução significativa nas feridas de maior diâmetro foi observada. Segundo BRASIL (2013), o óleo e a pomada a base de neem são utilizados para cicatrização, assepsia de ferimentos e tratamento de sarnas em cães e gatos.

2.5.3 Utilização na Saúde Bucal

Na Índia e na África, milhões de pessoas usam pequenos galhos de neem como escova de dente. Estudos recentes comprovam que infecções odontológicas estão sendo tratadas

utilizando-se tradicionalmente componentes isolados de partes do neem (ARAÚJO et al., 2010). Dentistas têm aprovado esta prática por acreditarem que ela realmente previne o aparecimento de doenças periodonticas (SOARES et al., 2006). O extrato de neem é rico em compostos antimicrobianos, que podem ser potencialmente úteis para controlar patógenos de origem alimentar e outros organismos deteriorantes (MAHFUZUL, 2007).

2.5.4 Ação Antiviral e Antimicrobiana

O neem indiano é uma planta medicinal conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, antialérgicas, antitumorais, entre outras (SILVA, 2020). Segundo Sarkar et al., (2020), nota-se também a potente atividade antiviral por diversos mecanismos distintos, seja desregulando a expressão de proteínas virais in vitro, inibindo a ligação entre o vírus e o hospedeiro, fusão célula-célula, a disseminação viral, replicação viral ou regulando negativamente os transcritos dos genes N e S virais, assim como a síntese viral da proteína N. KHAN (1986), verificou a toxicidade de formulados a base de neem em quatorze colônias de fungos comuns que infectam o homem, incluindo *Trichophyton spp.* causador do chamado “pé-de-atleta” e *Microsporum spp.*, os quais infectam cabelos, unhas e pele. SCHNEIDER (1986) demonstrou que o neem é capaz de combater inúmeras espécies de bactérias patogênicas, dentre elas, *Staphylococcus aureus*.

2.5.5 Efeito anti-inflamatório

As atividades anti-inflamatórias da semente do neem também foram relatadas, e de acordo com ILANGO (2013), os animais tratados com a dose de 100 mg/kg deste extrato exibiram atividades anti-inflamatórias significativas. Além disso, o efeito anti-inflamatório do óleo de semente de neem foi examinado em ratos, em um edema induzido por carragenina na pata posterior. O resultado confirmou que este óleo mostrou maior inibição do edema (NAIK,2014).

2.5.6 Ação Inseticida

SCHMUTTERER (1990) afirma que larvas de diversos mosquitos dos gêneros *Aedes spp.* e *Anopheles spp.* são sensíveis à azadiractina e mostram como sintomas da intoxicação a redução da alimentação e do crescimento. GONÇALVES et al. (2001) estudaram a ação de extratos aquosos de neem e cravo-da-índia (*Syzigium aromaticum L.*) na biologia do ácaro verde da mandioca (*Mononychellus tanajoa Bondar*). O efeito dos extratos foi avaliado através da observação da mortalidade e duração das fases imaturas, fecundidade e fertilidade das fêmeas.

Dentre os resultados, o extrato de neem 1% foi o que mostrou melhores resultados, causando a mortalidade de 72,5% no estágio larval de *M. tanajoa*.

FIGUEIREDO et al. (2002) descrevem a eficiência do óleo de neem e do extrato de fumo no controle do pulgão do pinus (*Cinara atlantica*) em condições de laboratório, concluindo que o neem é eficiente no controle deste afídeo, uma vez que nos tratamentos realizados houve mortalidade de mais de 90% das ninfas jovens e adultas.

2.5.7 Potencial Antifertilidade

GBOTOLORUN, et al. (2008) estudaram os efeitos do extrato alcoólico de flores de neem em ratas, objetivando observar seus efeitos no ciclo estral, ovulação, fertilidade e morfologia fetal. Os resultados deste estudo confirmaram claramente que o ciclo estral de 80% dos ratos foi alterado com um prolongamento acentuado da fase de diestro. Este extrato causou uma redução estatisticamente significativa no número de óvulos na manhã do estro.

2.5.8 Efeito Antidiabético

O extrato da folha de neem também foi avaliado por seu efeito antidiabético. DHOLI et al. (2011), em seu estudo confirmaram que ratos diabéticos tratados com extrato de neem (250 mg/kg) exibiram níveis de glicose significativamente menores em comparação ao grupo controle. AKTER (2013), sugeriu que extratos de folhas de *Azadirachta indica* e *Andrographis paniculata* têm atividade antidiabética significativa e podem ser uma fonte potencial para o tratamento de diabetes mellitus.

Tabela 2: Utilizações e Indicações do Neem.

PARTE DA PLANTA	ATIVIDADES	REFERÊNCIAS
Casca de folha, flor e caule	Antioxidante	SITHISARN, et al. (2005) GUIMERAY, et al. (2009)
Folha	Cicatrização de feridas	SINGH (2014) CHUNDRAN (2015)
Óleo de semente	Anti-inflamatório	ILANGO (2013) NAIK (2014)
Planta completa	Arborização em praças e ruas	FONTENELE, et al. (2020)
Óleo e pomada	Tratamento de sarna	BRASIL (2013)
Galhos	Infecções odontológicas Doenças periodonticas	ARAÚJO et al., 2010 SOARES et al., 2006) (MAHFUZUL, 2007).
Óleo de semente	Antimicrobiano Antialérgicas Antitumorais	SILVA (2020) KHAN (1986) SCHNEIDER (1986)
Caule	Construção de ferramentas, brinquedos, postes de rede elétrica, palanques, vigas para a construção civil e fabricação de móveis	BITTENCOURT (2009) SAXENA (2001)
Folhas e sementes	Fabricação de xampus, condicionadores, óleo para cabelos, sabonetes, pasta dental e filtro solar	BITTENCOURT (2009) CPT (2021) OSI (2021)
Óleo das folhas e sementes	Ação Inseticida	SCHMUTTERER (1990) GONÇALVES et al. (2001) FIGUEIREDO et al. (2002)
Extrato alcoólico de flores	Antifertilidade	GBOTOLORUN, et al. (2008)
O extrato da folha	Efeito antidiabético	DHOLI, et al. (2011) PATIL (1970)

Fonte: SILVA, 2022.

REFERÊNCIAS

- AKTER, R. et al. Comparative studies on antidiabetic effect with phytochemical screening of *Azadirachta indica* and *Andrographis paniculata*. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v. 5, n. 2, p. 122-128, 2013.
- ALVES, M. C. et al. Efeitos do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* Linn sobre parâmetros neurocomportamentais na prole de ratas tratadas durante a gestação e lactação. 2020.
- AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.16, n.2, p.189-203, 2002.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao desenvolvimento de Medicamentos, 2013.
- ANVISA- RDC nº26, de 13 de maio de 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf Acesso em: 05 /06/2021.
- ARAÚJO, N. R. R. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral. 2010.
- ASSIS, T. S. et al. Intoxicações por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa das perdas econômicas na Paraíba. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 1, p. 13-20, 2010.
- AULETTA, C. S. Acute, subchronic, and chronic toxicology. *Handbook of toxicology*, p. 51-162, 1995.
- AZEVEDO, G.T.O.S.; NOVAES, A.B.; AZEVEDO, G.B.; SILVA, H.F. Desenvolvimento de Mudanças de Nim Indiano sob Diferentes Níveis de Sombreamento. *Floresta e Ambiente*, v. 22, p. 249-255, 2015.
- BANSOD, Sapana et al. Nimbolide abrogates cerulein-induced chronic pancreatitis by modulating β -catenin/Smad in a sirtuin-dependent way. *Pharmacological Research*, v. 156, p. 104756, 2020.
- BERTOLAMI, M. C. Mecanismos de hepatotoxicidade. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, v. 85, p. 25-27, 2005.
- BISWAS, K. et al. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current science*, p. 1336-1345, 2002.
- BITTENCOURT, A. M. et al. O cultivo do nim indiano (*Azadirachta indica*): uma visão econômica. *Floresta*, v. 39, n. 3, 2009.
- BRAGA, T. M. et al. Biological activities of gedunin. A limonoid from the Meliaceae family. *Molecules*, v. 25, n. 3, p. 493, 2020.

- BRANCO, A. C. S. C. et al. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos wistar e camundongos swiss do biotério professor Thomas George. Rev Bras Ciênc Saúde, v. 15, n. 2, p. 209-14, 2011.
- BRASIL, R. B. Aspectos botânicos, usos tradicionais e potencialidades de *Azadirachta indica* (NEEM). Enciclopédia Biosfera, v. 9, n. 17, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2010. Fitoterápicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos> Acesso em: 28/04/2022.
- BRASÍLIA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília 2009: Mapa/Acs, 2009. 398 p.
- BROGLIO, M. S. M. F. et al. Extratos de plantas no controle de *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 18, p. 44-48, 2009.
- CABRAL, V. X.; FREITAS, S. P. Fitoterapia na Medicina Veterinária—uso de Sálvia e Tomilho: Revisão Bibliográfica. Anais congrega mic-ISBN 978-65-86471-05-2, v. 16, p. 557-561, 2020.
- CHIANESE, G. et al. Antiplasmodial triterpenoids from the fruits of neem, *Azadirachta indica*. Journal of natural products, v. 73, n. 8, p. 1448-1452, 2010.
- CHUNDRAN, N. K.; HUSEN, I. R.i; RUBIANTI, I. Effect of Neem leaves extract (*Azadirachta Indica*) on wound healing. Althea Medical Journal, v. 2, n. 2, p. 199-203, 2015.
- COSTA, E. M. et al. Extrato aquoso de sementes de nim no controle de *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) em meloeiro. Revista Ciência Agronômica, v. 47, p. 401-406, 2016.
- COSTA, E.L.N.; SILVA, R.F.P.; FIUZA, L.M. Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas. Acta Biologica Leopoldensia, 26(2): 173-185, 2004.
- CPT – CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS.
http://www.cpt.com.br/produtos/16_0486.php. Acesso em 25/11/2021.
- DA SILVA NETO, I. F. et al. Uma Revisão da Atividade Antiviral do Nim indiano e seu Potencial Frente ao Novo Coronavírus (sars-cov-2). Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management, v. 17, n. 1, 2020.
- DA SILVA, A. B; DE LUNA BATISTA, J; DE BRITO, C. H. Atividade inseticida do nim, *Azadirachta indica* A. Juss. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável, v. 4, n. 4, p. 2, 2009.
- DHOLI, S. K. et al. Avaliação antidiabética In Vivo do extrato de folhas de Neem em ratos induzidos por aloxana. Revista de ciência farmacêutica aplicada, v. 1, n. 4, pág. 100-105, 2011.
- DIAS, G. E. N. et al. Avaliação da toxicidade não-clínica do extrato etanólico bruto de *Pilosocereus gounellei* (FAC Weber) em ratos. 2015.

DIGITAL HERBARIUM OF CROP PLANTS. Disponível em:
<http://dhcrop.bsmrau.net/neem/>. Acesso em 10/02/2022.

DOUGHARI, J. H. Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. Rijeka, Croatia: INTECH Open Access Publisher, 2012.

ESTEVEZ, C. O. et al. Medicamentos fitoterápicos: prevalência, vantagens e desvantagens de uso na prática clínica e perfil e avaliação dos usuários. Revista de Medicina, v. 99, n. 5, p. 463-472, 2020.

FERNANDES, S. R. R. Doseamento da Azadiractina e avaliação da atividade antimicrobiana em produtos contendo óleo de Neem. 2014. Tese de Doutorado. Instituto Politecnico do Porto (Portugal).

FONTENELE, M. J. S. et al. Árvore neem (*Azadirachta indica* A. Juss): Aspectos positivos, um panorama brasileiro. Cadernos de Agroecologia, v. 15, n. 2, 2020.

FORIM, M. R. Estudo Fitoquímico do Enxerto de *Azadirachta indica* sobre a Melia azadirach: quantificação de substâncias inseticidas. São Carlos, SP, 2006.

GBOTOLORUN, S. C. et al. Potencial anti fertilidade do extrato da flor de Neem em ratas adultas Sprague-Dawley. African Health Sciences, v. 8, n. 3, pág. 168-173, 2008.

GHATULE, R. R. et al. Effect of *Azadirachta indica* leaves extract on acetic acid-induced colitis in rats: Role of antioxidants, free radicals and myeloperoxidase. Asian Pacific Journal of Tropical Disease, v. 2, p. S651-S657, 2012.

GILLOTT, C. Entomology. New York, Plenum, 798p, 2005.

GLINSUKON, T. et al. Acute toxicity of nimbolide and nimbic acid in mice, rats and hamsters. Toxicology letters, v. 30, n. 2, p. 159-166, 1986.

GÓIS, R. C. S. et al. Toxicidade reprodutiva da semente de neem (*Azadirachta indica*) em codorna (*coturnix coturnix japonica* linnaeus, 1758) macho: Características seminais, estudo histopatológico e Histomorfométrico do parênquima testicular. 2018.

GONÇALVES, M. E. C.; BLEICHER, E. Uso de extratos aquosos de nim e azadiractina via sistema radicular para o controle de mosca - branca em meloeiro. Revista Ciência Agronômica, v. 37, n. 2, p. 182-187, 2006.

GOUVÊA, C. F. Estudo do desenvolvimento floral em espécies arbóreas da família Meliaceae. 2005.

GREGER, H. et al. Flavalinas inseticidas e outros compostos de espécies de Fijian Aglaia. Fitoquímica, v. 57, n. 1, pág. 57-64, 2001.

HARAND, W. Processo de obtenção de uma solução hidrossolúvel de Azadirachtin por processo compatível com os princípios de química verde, 2016.

HERBÁRIO VIRTUAL. Disponível em:
<https://sites.google.com/site/virtualherbario/herbario-virtual/home/nim-neem>. Acesso em: 10/02/2022.

IAC. INSTITUTO AGRONÔMICO DE SÃO PAULO. 2021. Disponível em: <https://www.iac.sp.gov.br/>. Acesso em 02/02/2022.

ILANGO, K.; MAHARAJAN, G.; NARASIMHAN, S. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of *Azadirachta indica* fruit skin extract and its isolated constituent azadiradione. *Natural Product Research*, v. 27, n. 16, p. 1463-1467, 2013.

ISMAN, M. B. et al. Insecticidal and antifeedant bioactivities of neem oils and their relationship to azadirachtin content. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 38, n. 6, p. 1406-1411, 1990.

JÚNIOR, H. B. P. et al. Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em camundongos. *Ciência Animal Brasileira*, v. 13, n. 4, p. 512-519, 2012.

KHAN, M.; WASSILEW, W. The effect of raw material from the neem tree, neem oil and neem extracts on fungi pathogenic to humans. p. 645-652. In: *Natural Pesticides from the Neem Tree (Azadirachta indica A. Juss) and others tropical plants*. Proc. 3rd Int. Neem Conf., Nairobi, Kenya, 1986.

LIPINSKI, L.C.; MARTINEZ, J.L.; SANTOS, M.V.R.; FERREIRA, J.N.; PFAU, D.R. Avaliação do efeito anti-helmíntico e das alterações metabólicas em búfalos (*Bubalus bubalis*) com administração da torta de Neem e do alho desidratado no Sul do Paraná. *Revista Brasileira de Agroecologia*. v.6, n.3, p.168- 175,2011.

MABBERLEY, D. J; PANNELL, C. M; SING, A. M. Meliaceae. *Flora Malesiana-Series 1, Spermatophyta*, v. 12, n. 1, p. 1-407, 1995.

MACIEL, M. V. et al. Atividade inseticida in vitro do óleo de sementes de nim sobre *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 19, p. 07-11, 2010.

MAHFUZUL, H; M. D. et al. Antibacterial activity of guava (*Psidium guajava* L.) and neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) extracts against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Foodborne pathogens and disease*, v. 4, n. 4, p. 481-488, 2007.

MELLO, J. R.B et al. Toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Gossypium herbaceum* (algodoeiro) em ratos Wistar. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 27, n. 1, p. 46, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

MOSSINI, S.A.G; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. *Acta Farm. Bonaerense*- vol. 24 nº1. 139148 - ano 2005.

MOTTIN, T. S. Tóxicos que interferem no transporte de oxigênio pela hemoglobina. Porto Alegre, 2009.

MUELLNER, A. N. et al. Molecular phylogenetics of Meliaceae (Sapindales) based on nuclear and plastid DNA sequences. *American Journal of Botany*, v. 90, n. 3, p. 471-480, 2003.

NAIK, M. R. et al. Study of anti-inflammatory effect of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on infected albino rats. *Journal of Health Research and Reviews*, v. 1, n. 3, p. 66, 2014.

NEVES, E. J. M. Importância dos fatores edafo-climáticos para o uso do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) em programas florestais e agroflorestais nas diferentes regiões do Brasil. *Pesquisa Florestal Brasileira*, n. 49, p. 99-107, 2004.

NEVES, E. J. M; CARPANEZZI, A. A. O cultivo do nim (*Azadirachta indica*) para produção de frutos no Brasil. Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2008.

NIZIO, D. A. C. et al. Estudo fitoquímico e atividades antifúngica e antiprotozoária do óleo essencial de genótipos de erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq.). 2015.

NUNES, I.J. *Nutrição Animal Básica*. 2.Ed. Belo Horizonte. FCP-MVZ ED. 1998.

OLIVEIRA, M. B. et al. Extração, Caracterização E Avaliação Da Atividade Larvicida Do Óleo Essencial Do Citrus Limon Linneo (Limão) Frente Ao Mosquito *Aedes Aegypti*. 2013.

OLSON, H. et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 32, n. 1, p. 56-67, 2000.

OSUNWOKE, E. A. et al. The wound healing effects of aqueous leave extracts of *Azadirachta indica* on wistar rats. *J Nat Sci Res*, v. 3, n. 6, p. 181-186, 2013.

PATEL, S. M. et al. Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2016. p. 100-115.

PATIL, P. et al. Atividade antidiabética do extrato alcoólico da casca da raiz de Neem (*Azadirachta indica*). *Revista Nacional de Fisiologia, Farmácia e Farmacologia* v. 3, n. 2, pág. 142-142, 1970.

PEREIRA, J. B. A. et al. O papel terapêutico do Programa Farmácia Viva e das plantas medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 17, p. 550-561, 2015.

PESSOA, M. C. P. Avaliação da toxicidade do Extrato contendo NIM (*Azadirachta indica* L.), Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) e Cana de açúcar (*Saccharum officinarum* L) em ratas wistas. Programa de Pós-graduação em Ciência veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

RAHMANI, A. et al. Pharmacological and therapeutic potential of neem (*Azadirachta indica*). *Pharmacognosy Reviews*, v. 12, n. 24, 2018.

RAMALHO, O. L. F. et al. Cultivo de meliáceas arbóreas no Brasil. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science/Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*, v. 12, n. 2, 2019.

REFLORA-HERBÁRIO VIRTUAL. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/ConsultaPublicoHVUC/ConsultaPublicoHVUC.do?idTestemunho=4598118> Acesso em 14/02/2022.

SANTOS, R. L. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. *Revista brasileira de plantas medicinais*, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.

SARAVANAN, M. et al. Toxicidade de extratos de folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) em alguns parâmetros hematológicos, ionoregulatórios, bioquímicos e enzimológicos da carpa maior da Índia, *Cirrhinus mrigala*. Revista de Florestas Tropicais e Meio Ambiente, v. 1, n. 1, 2011.

SARKAR, L. et al. *Azadirachta indica* A. Juss melhora a desmielinização neuroinflamatória induzida pelo vírus da hepatite de camundongo pela modulação da fusão célula a célula em um modelo animal experimental de esclerose múltipla. *Frontiers in cell neuroscience*, v. 14, p. 116, 2020.

SAXENA, R. C. Neem in the new millenium: business opportunities unlimited. 2001.

SCHLUTER, U; SCHULZ, W. D. Structural damages caused by neem in *Epilachna varivestis*: a summary of histological and ultra-structural damage. 1. Tissues affected in larvae. In: *Proceedings 2nd International Neem Conference Rottach*. Egern. 1983.

SCHMUTTERER, Heinrich. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual review of entomology*, v. 35, n. 1, p. 271-297, 1990.

SCHNEIDER, B. H. The effect of neem leaf extracts on *Ephilachna varivestis* and *Staphylococcus aureus*. In: *Natural Pesticides from the Neem Tree (Azadirachta indica* A. Juss) and others tropical plants. *Proc. 3rd International. Neem Conference*. Nairobi, Kenya, Jul 1986.

SCHUMACHER, Marc et al. Anti-inflammatory, pro-apoptotic, and anti-proliferative effects of a methanolic neem (*Azadirachta indica*) leaf extract are mediated via modulation of the nuclear factor- κ B pathway. *Genes & nutrition*, v. 6, n. 2, p. 149-160, 2011.

SILVA, V. C. L. Avaliação da toxicidade reprodutiva de ratas Wistar submetidas à ingestão do extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica*). 2010. 50 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2010.

SINGH, A. et al. Effect of Neem oil and Haridra on non-healing wounds. *Ayu*, v. 35, n. 4, p. 398, 2014.

SINNIAH, D.; BASKARAN, G. Margosa oil poisoning as a cause of Reye's syndrome. *RI*, v. 317, n. 8218, p. 487-489, 1981.

SITHISARN, P; SUPABPHOL, R; GRITSANAPAN, Wandee. Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, n. 1, p. 109-112, 2005.

SOARES FILHO, C. V. et al. Óleo de Neem (*Azadirachta indica*) nos parâmetros parasitológicos, hematológicos e bioquímicos de ovinos naturalmente infectados por nematoides gastrintestinais. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v. 16, p. 408-419, 2015.

SOARES, F. P. et al. Cultivo e usos do Nim (*Azadirachta indica* A. Juss). *Boletim Agropecuário-Universidade Federal de Lavras*. Ed. UFLA, 2006.

SOTO, J. C. H. et al. Policitemia e eritrocitose em animais domésticos: Revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, v. 6, n. 11, p. 1-7, 2008.

STEVENS, K. R.; MYLECRAINE, L. Issues in chronic toxicology. Principles and methods of toxicology, v. 673, 1994.

TAYADE, D. V. Effect of phytochemical azadirachtin on the morphology and cytology of the testis follicle of th Indian grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. Biosci Discov, v. 3, n. 1, p. 79-81, 2012.

TUROLLA, M. S. R; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

UCHEGBU, M. et al. A crescente importância do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) na agricultura, indústria, medicina e meio ambiente: Uma revisão. Revista de Pesquisa de Plantas Medicinais, v. 5, n. 3, pág. 230-245, 2011.

VALLADARES, G. R et al. Efeitos de *Melia azedarach* em *Triatoma infestans*. Fitoterapia, v. 70, n. 4, pág. 421-424, 1999.

CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DA AZADIRACHTA INDICA EM RATOS ¹

Resumo

O neem (*Azadirachta indica*) é uma espécie arbórea da família Meliaceae, que vem sendo utilizada para os mais variados fins, estes incluem, atividades antivirais, antibacterianas, anti-inflamatórias e cicatrizantes. No entanto, é sabido que muitas plantas medicinais apresentam substâncias que podem desencadear reações tóxicas, tornando cada vez mais importantes estudos objetivando caracterizar tais efeitos. Por esta razão, o presente trabalho objetivou avaliar o perfil toxicológico do extrato aquoso de *Azadirachta indica* na dose de 2.000 mg/kg. Foram utilizados 16 *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar machos. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle e grupo tratado. Cada grupo foi formado por 8 animais. Ao grupo controle foi administrado o veículo de diluição do extrato, a água. Já o grupo tratado, foi submetido à dose única de 2000mg mg/kg do extrato aquoso de *Azadirachta indica*, por via oral. Foram realizadas análises hematológicas, bioquímicas, análise comportamental, avaliação de peso, mortalidade, ingestão de água e ração, como também avaliação dos parâmetros histopatológicos dos rins e fígado. Os resultados não mostraram alterações no consumo e ganho de peso, nem nos parâmetros comportamentais. Já as análises dos parâmetros sanguíneos apresentaram aumento em hemoglobina, leucócitos, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e creatinina. Através das análises histopatológicas detectou-se alterações significativas no fígado que apresentou vacuolização nos hepatócitos e nos rins com acentuada congestão dos vasos sanguíneos do interstício renal. Portanto, conclui-se que o extrato aquoso de *A. indica* demonstrou indícios de alterações nefrotóxicas e hepatotóxicas quando administrado por via oral na dose de 2.000 mg/kg.

Palavras-Chave: extrato de neem; plantas tóxicas; *Azadirachta indica*.

Abstract

Neem (*Azadirachta indica*) is a tree species of the Meliaceae family, which has been used for the most varied purposes, these include antiviral, antibacterial, anti-inflammatory and healing activities. However, it is known that many medicinal plants have substances that can trigger toxic reactions, making studies increasingly important to characterize such effects. For this reason, the present study aimed to evaluate the toxicological profile of the aqueous extract of *Azadirachta indica* at a dose of 2,000 mg/kg. Sixteen male Wistar *Rattus norvegicus* were used. The animals were divided into two groups: control group and treated group. Each group consisted of 8 animals. The control group was administered the extract dilution vehicle, water. The treated group was submitted to a single dose of 2000mg mg/kg of aqueous extract of *Azadirachta indica*, orally. Hematological, biochemical, behavioral analysis, weight assessment, mortality, water and food intake, as well as evaluation of histopathological parameters of the kidneys and liver were performed. The results showed no changes in consumption and weight gain, nor in behavioral parameters. The analysis of blood parameters showed an increase in hemoglobin, leukocytes, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase and creatinine. Through histopathological analysis, significant changes were detected in the liver, which showed vacuolization in hepatocytes and in the kidneys with marked congestion of blood vessels in the renal interstitium. Therefore, it is concluded that the aqueous extract of *A. indica* showed evidence of changes in nephrotoxicity and hepatotoxicity when administered orally at a dose of 2.000 mg/kg.

Keywords: neem extract; toxic plants; *Azadirachta indica*.

¹ Artigo submetido à revista Ciência Animal Brasileira

INTRODUÇÃO

Ao longo do tempo, as plantas têm desempenhado um papel importante no tratamento de diferentes doenças. Diversas espécies vegetais possuem, em um ou mais de seus órgãos, substâncias que podem ser usadas para fins terapêuticos (DOUGHARI, 2012). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estas são chamadas de plantas medicinais. *Azadirachta indica*, vulgarmente conhecido como neem, uma árvore perene da família Meliaceae, nativa da Índia, que tem sido usada por milhares de anos em sistemas tradicionais de medicina (BRASIL, 2006).

O neem foi disseminado rapidamente no semiárido do nordeste brasileiro por ser resistente à seca, tolerante à maioria dos solos, incluindo os poucos profundos, secos, pedregosos e areias altamente lixiviadas, por apresentar crescimento rápido, produzir grande quantidade de folhas sempre verdes e proporcionar boa qualidade de sombra (AZEVEDO et al., 2015).

A maioria dos componentes da semente do neem que foram caracterizados, pertencem à classe dos terpenos e são denominados limonóides, essas substâncias são conhecidas como meliacina. Dentre os limonoides presentes nas sementes, a azadiractina tem maior importância por ser responsável pela maioria dos efeitos biológicos os quais incluem, atividade vermífuga, antibacteriana e cicatrizantes (AZEVEDO et al., 2015).

Embora várias partes do neem tenham um uso extensivo em sistemas tradicionais da medicina, a mensuração da toxicidade de seus compostos naturais é crucial antes de sua aplicação terapêutica (PATEL, 2016). Estudos baseados em modelos animais confirmaram que, em certas dosagens, o neem é seguro, mas por outro lado, seus compostos podem apresentar efeitos tóxicos/adversos, como êmese, toxicidade hepática, acidose metabólica e encefalopatia (ALZOHAIY, 2016).

Nessa perspectiva, o presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade de dose aguda do extrato aquoso da semente de neem em ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) através de diferentes análises, dentre elas: análise comportamentais, avaliação de peso, mortalidade, análises hematológicas e bioquímicas de sangue e caracterização das possíveis alterações histopatológicas nos rins e fígado causadas pelo extrato.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Histologia Animal do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e está de acordo com os princípios éticos e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (Certidão de aprovação nº 4875230221). O processamento e análise dos órgãos foram realizados no Laboratório de Prática e Processamento Histopatológico – LPPH/DMORF/CCS e no Laboratório de Processamento de Amostras Biológicas e Histotecnologia – LAPABH/ETS/UFPB.

Foram utilizados 16 *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar machos, com idade média de 8 semanas, pesando entre 150 a 220g. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle e grupo tratado. Cada grupo foi formado por 8 animais, sendo todos machos.

Posteriormente foram alojados em caixas de polietileno em condições controladas de laboratório (12h ciclo claro/escuro, temperatura: 22 ± 2 °C) e com um período de aclimação de 7 dias antes do experimento. Ao grupo controle foi administrado o veículo de diluição do extrato, a água. Já o grupo tratado, foi submetido à dose única de 2000 mg/kg do extrato aquoso da semente de *Azadirachta indica*, por via oral (gavagem). Todos os animais receberam ração (pellets) e água *ad libitum*.

Para obtenção das sementes e preparo do extrato aquoso, foram coletados frutos maduros de neem em plantas pertencentes ao Engenho Patrimônio no município de Condado - Pernambuco (Latitude: 7° 35' 34" Sul, Longitude: 35° 6' 12" Oeste e 125 m de altitude). As sementes foram extraídas, retirando-se a casca e a polpa dos frutos, e posteriormente secas à sombra e sob temperatura ambiente. Após a secagem, as sementes passaram pelo processo de trituração em moinho ajustável até a obtenção do pó de acordo com as regras para análise de sementes (BRASÍLIA, 2009). Procedimento realizado no Laboratório de Pesquisas Aplicadas à Biofábrica do CETENE/PE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste). O mesmo foi mantido em temperatura ambiente e no momento do uso, pesado e dissolvido em água. Foram adicionados 100ml de água destilada à 50g do extrato, sendo a mistura mantida em repouso por 24 horas, em ambiente escuro, para extração das substâncias bioativas. A mistura foi filtrada em tecido voal fino antes da administração. Para o preparo do extrato, seguiu-se a metodologia descrita por Costa et al. (2016).

Os protocolos experimentais foram baseados na RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamento fitoterápico e a notificação de produtos fitoterápicos na Instrução Normativa nº4, de 18 de junho de 2014 (ANVISA, 2014). Segundo o Guia da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD 423), as doses fixas administradas para estudos de toxicidade devem estar entre 5 e 2000 mg/kg, por via oral (BRASIL, 2010). Sendo assim, a utilização de uma dose de 2000mg/kg é o suficiente para realizar análises de caráter tóxico de uma substância.

Após as administrações (hora zero) os animais foram avaliados clinicamente nos intervalos: 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos, para detectar quaisquer sinais de toxicidade e mudanças no comportamento, piloereção, diarreia, salivação excessiva, redução na locomoção e mortalidade. Diariamente, foram avaliados o consumo de água e de ração.

Foram coletadas amostras de sangue de todos os animais após 14 dias da administração do extrato, obtidas por meio da punção da veia caudal, seguindo as diretrizes do CONCEA. Os parâmetros sanguíneos analisados foram: glicose, creatinina, triglicerídeos, colesterol total, proteínas totais, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, hemácias, hemoglobina, hematócrito, plaquetas e leucócitos. O processamento das amostras de sangue foi realizado pelo analisador hematológico veterinário Midray bc vet, seguindo a metodologia e recomendações do fabricante (MIRANDA, 2014).

No 14º dia, após a administração, os animais foram eutanasiados com cetamina (225mg/kg) e xilazina (30mg/kg), após a observância da completa sedação do animal e ausência de reflexo, os mesmos foram submetidos a um deslocamento cervical e seus órgãos coletados (fígado e rins).

A análise histopatológica foi realizada a partir de fragmentos isolados dos rins e fígado, dos grupos tratado e controle. Com posterior fixação em formol a 10%, tamponado durante 24 horas, em seguida lavados em água corrente para a retirada de todo resíduo do fixador. Após fixadas, as amostras foram clivadas e acondicionadas em cápsulas histológicas e submetidas ao processamento overnight em histotécnico (Leica® modelo RM 2145), sendo desidratadas em doses crescentes de álcool etílico (álcool a 70, 80, 90% e álcool absoluto), diafanizadas em xilol e infiltradas com parafina histológica.

Realizou-se a inclusão do material em parafina e os cortes histológicos com uma espessura de 5µm foram efetuados no micrótomo rotativo RM2125 RTS (Leica Biosystems).

Os cortes foram dispostos em lâmina de vidro de 75 x 25 mm³, realizado dois níveis de corte para cada área de estudo, corados com hematoxilina-eosina e montados em bálsamo do Canadá, para proceder a avaliação de alterações teciduais em microscopia óptica.

Foram utilizadas adaptações no modelo usado por Góis et al. (2018) para avaliação histopatológica, sendo as alterações teciduais classificadas de acordo com o seguinte escore: ausente (-), quando não houver alterações; leve (+), quando afetar até 30% da área avaliada; moderada (++) quando afetar de 30 a 70% da área e intensa (+++) quando afetar mais de 70% da área avaliada.

Para a análise estatística dos parâmetros de análise comportamental, avaliação de peso, mortalidade, ingestão de água e ração, análises hematológicas e bioquímicas utilizou-se Teste T de Student considerando a margem de significância de 5%. Os dados descritos por escores ou gravidade foram submetidos a análise descritiva. A avaliação estatística foi realizada no software “GraphPad Prism” versão 9.0.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A segurança no uso de drogas vegetais só pode ser avaliada quando se analisa uma série de fatores, como variações de peso corpóreo, parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue, além das características biológicas dos indivíduos, que por sua vez, são mensurados por meio das análises comportamentais, avaliação ponderal e de mortalidade (RAMALHO,2019).

A toxicidade aguda pode ser definida como efeito adverso produzido em um curto período de tempo após administração de uma dose única de uma substância. A dose em estudo foi determinada de acordo o Guia da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD 423), sendo 2000mg/kg a dose indicada para testar substâncias por via oral a fim de caracterizar possíveis efeitos de toxicidade.

Após o tratamento com o extrato aquoso de *A. indica* por via oral, não foram observadas no grupo tratado alterações nas primeiras 24 h, nem tão pouco durante os 14 dias do experimento, quando comparados ao grupo controle. Kingsley et al. (2012), após administrarem de forma oral, em camundongos, diferentes doses de extratos aquosos das folhas de *A. indica* (1250, 2500 e 5000 mg/kg), relataram que não foram observados efeitos colaterais tóxicos visíveis e os camundongos tratados foram considerados saudáveis e normais, sem registro de perda de peso, perda de pelo, ou outros sinais de desconforto.

Kanagasanthosh et al. (2015) avaliaram a toxicidade aguda do extrato etanólico das folhas de *A. indica* por 14 dias em ratos, com doses orais de 20, 200 e 2.000 mg/kg, também não foram observadas alterações significativas nas respostas comportamentais ou autonômicas dos animais, e nenhuma mortalidade foi registrada.

Em outro estudo testaram a toxicidade aguda do extrato hidroetanólico das folhas de *Azadirachta indica* em *R. norvegicus*, por via oral em dose única (2.000 mg/kg). Neste estudo também nenhum animal apresentou alterações na aparência geral, nenhuma manifestação de tremores, convulsões, salivação, diarreia, coma ou comportamentos anormais, como autolesão ou andar para trás (TEPONGNING et al. 2018).

Corroborando a literatura conclui-se que a administração do extrato aquoso de *A. indica* não causa alterações nos parâmetros comportamentais (KINGSLEY, 2012; KANAGASANTHOSH, 2015 e TEPONGNING, 2018).

No presente estudo não foi evidenciado episódios de mortalidade após o tratamento com *A. indica*. A toxicidade aguda do extrato aquoso de folhas de *A. indica* foi avaliada por Dorababu et al. (2006) em diferentes doses (200, 500, 1000 e 2500 mg/kg), por um período de observação de 24h, e não foi observada mortalidade nos grupos analisados. Achi et al. (2018) também relataram que após a administração de diferentes doses de extratos etanólicos de folhas de *A. indica*, por via oral em camundongos (50 a 5000 mg/kg) não houve mortalidade dos animais.

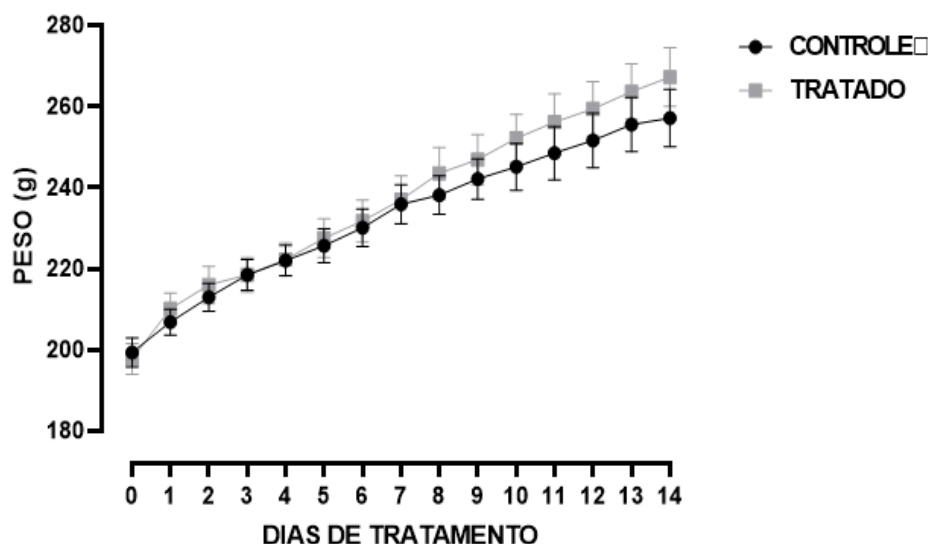
Ghatule et al. (2012) também ao administrarem por via oral extrato etanólico de folhas de *A. indica* na dose de 5 g/kg em camundongos durante 7 dias relatou que o estudo de toxicidade aguda não causou mortalidade ou outros efeitos adversos relacionados ao sistema nervoso autônomo, e sistema nervoso central, indicando sua segurança.

Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo corroboram os descritos na literatura de que o extrato aquoso de *A. indica* não apresenta grau de toxicidade que ocasione morte dos animais (DORABABU, 2006; ACHI, 2018; GHATULE, 2012).

Com o intuito de realizar avaliação ponderal, os animais foram pesados antes e depois da administração do composto, e diariamente durante os 14 dias do experimento. De acordo com Harkness (1993), um rato adulto, pesando aproximadamente 300g, consome por dia em média cinco gramas de ração e 10 ml de água para cada 100g do seu peso corporal. No entanto, o consumo pode variar de acordo com a temperatura e umidade do ambiente.

A evolução de peso dos ratos, não demonstrou variações significativas, entre grupo tratado e o seu respectivo grupo controle (Figura 1).

Figura 1: Gráfico de dispersão da variação de peso dos ratos Wistar dos grupos controle e tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica* (2.000 mg/kg).



Valores da média $\pm$ dp e análise estatística por teste t de Student, com significância $p^* < 0.05$

Boadu et al. (2001) ao avaliarem o efeito tóxico do extrato aquoso das folhas de *A. indica* em coelhos, observou aumento progressivo do peso corporal, tanto nos animais de teste como nos de controle, não havendo uma diferença significativa no ganho de peso entre os dois grupos, resultado também encontrado em nosso estudo.

Tepongning et al. (2018) após administrarem extrato hidroetanólicos das folhas de *A. indica* por via oral em dose única (2.000 mg/kg) em *R. norvegicus* também relataram que não foram registradas divergências significativas no peso dos animais.

Além do monitoramento do peso dos animais, foram avaliados parâmetros como consumo de ração e água, diariamente, durante os 14 dias de experimento, uma vez que a toxicidade sistêmica também se manifesta através da redução nos consumos de água e ração (CUNHA, 2009). O consumo de água e nutrientes são parâmetros fundamentais para avaliar a segurança de um produto com fins terapêuticos. Pois estes são essenciais para o bom funcionamento do sistema fisiológico e, conseqüentemente, para uma adequada resposta à droga testada, já que condições nutricionais impróprias podem acarretar deficiência do organismo (STEVENS, 1994). Durante o período experimental não foram observadas alterações significativas quanto ao consumo de água e ração (Tabela 1).

Tabela 1: Consumo médio de ração e água dos ratos Wistar machos, dos grupos controle e tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica* (2.000 mg/kg).

CONSUMO DE RAÇÃO (g)		CONSUMO DE ÁGUA (ml)	
Grupo Controle	Grupo Tratado	Grupo Controle	Grupo Tratado
97,92 ± 5,11a	101,14 ± 5,19a	122,67 ± 8,17a	133,81 ± 13,74a

Os valores representam a média + E.P.M. dos respectivos dias de experimento, considera-se 4 animais/gaiola. ml – representa mililitros, g- representa gramas. Letras diferentes nas colunas ou linhas significam diferenças estatísticas, quando comparados ao grupo controle (Teste t) ao nível de 5% de significância.

Desta forma, podemos inferir que o extrato aquoso de *A. indica* quando administrada por via oral na dose única de 2000 mg/kg não apresentou toxicidade expressiva capaz de alterar parâmetros como análise comportamental, avaliação ponderal e mortalidade.

No entanto, de acordo com Gonzalez e Silva (2003), outros sinais de toxicidade podem se expressar através da alteração da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas sanguíneas. Sendo assim, tais parâmetros também foram avaliados.

A análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos é de extrema importância para avaliação dos riscos de substâncias, pois o sistema hematológico evidencia os primeiros sinais de toxicidade, sendo um alvo bastante suscetível aos efeitos causados por substâncias tóxicas, tornando-se assim, importante sistema para análise do estado de saúde físico e patológico de humanos e animais (OLSON et al. 2000; FAILACE, 2009).

Dentre os parâmetros analisados, observou-se alteração significativa nos valores de hemoglobina, uma vez que os animais do grupo tratado apresentaram aumento quando comparados aos do grupo controle (Tabela 2). No entanto, tais valores encontram-se ainda dentro dos valores de referência para a espécie (DINIZ et al. 2006; LIMA, 2014).

Uma possível explicação para a elevação dos números de eritrócitos, é destacada por Soto (2008) o qual demonstrou que a concentração de hemoglobina e do volume globular podem ser ocasionados por desidratação ou por uma condição de estresse temporário no qual o baço se contrai, liberando hemácias extras na corrente sanguínea.

De tal forma, um estudo desenvolvido por Coelho et al. (2020), onde avaliaram os efeitos hematológicos e hepáticos da torta de Neem (*Azadirachta indica*) em ovinos, observaram que o volume globular (VG) e a concentração de hemoglobina apresentaram-se

aumentadas em todos os grupos tratados, entretanto os valores permaneceram dentro dos valores de referência para ovinos, e por tal motivo a alteração nestes parâmetros foi considerada sem significado clínico.

Nesse estudo os leucócitos totais, apresentaram aumento significativo no grupo tratado com o extrato de *A. indica* em relação ao grupo controle, entretanto esta variabilidade permaneceu dentro do estabelecido como referência para a espécie em estudo. As alterações quantitativas dos leucócitos são identificadas quando os valores excedem ou estão abaixo dos intervalos de referência para cada espécie. Em situações de estresse agudo (mediado por adrenalina) ou crônico (aumento do cortisol) pode ocorrer leucocitose no hemograma. A adrenalina promove a desmarginação dos leucócitos do compartimento marginal para o compartimento circulante resultando em leucocitose, neutrofilia ou linfocitose (SILVA, 2001).

Haque et al. (2008) testaram a toxicidade de extratos aquosos de *A. indica*, no que chamaram de preparação de folhas de neem (PLN). Os camundongos foram tratados com 0,5, 1 ou 2 unidades de PLN semanalmente por 28 dias. O tratamento com PLN estimulou os sistemas hematológicos, evidenciado pelo aumento na contagem total de glóbulos vermelhos e brancos, plaquetas e porcentagem de hemoglobina.

O mesmo ocorreu em estudo que avaliou o perfil toxicológico da glicoproteína da folha de nim (NLGP) em camundongos e ratos. Diferentes doses de NLGP (25, 50, 100 e 200 µg) foram injetadas semanalmente nos animais durante quatro semanas. Notou-se hematoestimulação, evidenciada pelo aumento do conteúdo de hemoglobina, número de linfócitos e contagem de leucócitos (MALLICK et al. 2013).

Tabela 2: Parâmetros hematológicos de ratos Wistar machos, dos grupos controle (água) e tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica* (2.000 mg/kg).

Parâmetros	Controle (n=8)	<i>A. indica</i> 2000 (n=8)
Hemácias (mm ³)	6,22 ± 0,49a	6,60 ± 0,25a
Hemoglobina (g dL)	14,12 ± 0,30b	15,16 ± 0,18a
Hematócrito (%)	37,13 ± 0,32a	36,60 ± 0,68a
Plaquetas (mm ³)	727,37 ± 37,51a	703,90 ± 50,62a
Leucócitos Totais (mm ³)	6,33 ± 1,41b	11,50 ± 1,81a
Neutrófilos (%)	25,75 ± 1,92a	22,50 ± 4,30a
Eosinófilos (%)	1,00 ± 0,00a	1,00 ± 0,00a
Linfócitos (%)	64,12 ± 1,69a	67,90 ± 4,53a
Monócitos (%)	9,25 ± 0,82a	8,60 ± 1,40a

Os valores representam a média + E.P.M. do número de animais usados no experimento. n – representa o número de animais em cada grupo. Letras diferentes nas colunas ou linhas significam diferenças estatísticas, quando comparados ao grupo controle (Teste t) ao nível de 5% de significância.

Os demais parâmetros avaliados neste estudo, tais como: hemácias, hematócrito, plaquetas, neutrófilos, eosinófilo, linfócitos e monócitos não foram alterados pelo tratamento com *A. indica* quando comparados aos do grupo controle.

Já em outro estudo avaliaram o efeito tóxico do extrato aquoso das folhas de *A. indica* administrado por via oral durante 14 dias em coelhos. Os autores afirmam que não houve alterações em nenhum dos parâmetros sanguíneos (BOADU et al., 2001).

Corroborando o estudo acima, em estudo sobre a toxicidade subaguda de extratos aquosos de folhas de *A. indica*, na dose de 1000 mg/kg, por via oral em ratos, durante 28 dias, observaram alterações nos parâmetros hematológicos. Já os testes de função hepática e renal revelaram pouca ou nenhuma alteração em relação aos valores do controle (DORABABU et al., 2006).

Dessa forma, apesar de ter sido observado alterações nos parâmetros de hemoglobina e leucócitos totais, não é possível inferir que tais alterações seriam resultantes do efeito tóxico causado pelo extrato de *A. indica*. Uma vez que tais resultados se encontram dentre os valores de referência, descritos para a espécie (DINIZ et al. 2006; LIMA, 2014).

As análises bioquímicas realizadas no soro sanguíneo dos animais representam um valioso apoio ao diagnóstico clínico das enfermidades, e tem muito valor quanto ao mapeamento de efeitos tóxicos indicando até mesmo o órgão e/ou sistema afetado (RAMALHO, 2019).

Com relação aos dados obtidos após a análise dos parâmetros bioquímicos, destaca-se que não verificou-se alteração na concentração sanguínea dos níveis de: glicose, triglicerídeos, colesterol e proteínas totais entre os animais do grupo controle e tratado com *A. indica*.

No entanto, foram observadas alterações significativas nos valores de ALT, AST e FA (Tabela 3). Tais parâmetros apresentaram aumento significativo no grupo tratado quando comparado ao grupo controle, como também encontram-se acima dos valores de referência descritos por Diniz et al. (2006). Segundo Gonzalez (2003), alterações nas transaminases são indicadoras de hepatopatias agudas em cães, gatos, coelhos, ratos e primatas, principalmente em doenças hepatocelulares, necrose hepática, obstrução biliar, intoxicações e infecções parasitárias.

Os achados da presente pesquisa, corroboram Ashafa (2012), que ao administrar extrato etanólico da casca do caule de *A. indica* em ratos, por 21 dias nas doses: 50, 100, 200 e 300 mg/kg, observou que após o tratamento, e especialmente em doses mais elevadas, houve alterações nas transaminases, fosfatase alcalina, cálcio, sódio e potássio.

Estes resultados podem representar indícios de um possível efeito hepatotóxico induzido pelo extrato aquoso das sementes de *A. indica*. Entretanto, é necessário realizar um estudo mais específico para avaliar tal condição.

Tabela 3: Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratos Wistar machos, dos grupos controle (água) e tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica* (2.000 mg/kg).

Parâmetros	Controle (n=8)	2000mg/kg (n=8)
Glicose (g/dL)	84,12 ± 3,43a	73,87 ± 10,67a
Creatinina (ng/dL)	0,68 ± 0,09b	0,92 ± 0,06a
Triglicerídeos (g/dL)	92,00 ± 15,34a	162,75 ± 33,67a
Colesterol Total (g/dL)	59,37 ± 9,61a	96,12 ± 12,08a
Proteínas Totais (g/dL)	6,25 ± 0,11a	6,16 ± 0,10a
AST (U/L)	79,12 ± 1,44b	123,50 ± 6,00a
ALT (U/L)	56,12 ± 1,96b	66,50 ± 3,14a
Fosfatase alcalina (UI/L)	167,00 ± 2,09b	287,87 ± 27,72a

Os valores representam a média + E.P.M. do número de animais usados no experimento. n – representa o número de animais em cada grupo. Letras diferentes nas colunas ou linhas significam diferenças estatísticas, quando comparados ao grupo controle (Teste t) ao nível de 5% de significância.

A análise dos valores de creatinina demonstrou que o grupo tratado com *A. indica* apresentou aumento significativo quando comparado ao grupo controle. Esta elevação superou os limites dos valores de referência para a espécie (DINIZ et al., 2006). De acordo com Gonzalez (2017), a excreção de creatinina só se realiza por via renal, uma vez que ela não é reabsorvida nem reaproveitada pelo organismo, de forma que níveis altos de creatinina indicam uma deficiência na funcionalidade renal.

Kupradinum et al. (2010) após alimentarem ratos com extrato metanólico de flores de *A. indica* em 0,5% de tragacanto, nas doses de 150, 750 e 1500 mg/kg também observaram que os valores de fosfatase alcalina, creatinina e potássio foram significativamente maiores nos grupos que receberam doses acima de 750 mg/kg. Dessa forma, os autores concluíram que o extrato testado apresentou toxicidade para ratos em doses superiores a 150 mg/kg para rim e fígado.

A toxicidade hepática do extrato etanólico de folhas de *A. indica* foi testada também por Tepongning (2018), em doses orais de 75, 150 e 300 mg/kg. Observou-se que alterações significativas em aspartato aminotransferase (AST) dos animais tratados com 300 mg/kg, sugerindo disfunção muscular ou lesão hepática, o que foi confirmado posteriormente por meio da análise histopatológica.

Rahman e Siddiqui (2004) estudaram os efeitos bioquímicos do vepacida em ratos nas doses de 80, 160 e 320 mg/kg. Vepacida é um pesticida à base de neem, obtido pelo isolamento

de um sólido de fluxo livre de grãos de sementes de *A. indica*. Observaram aumento da fosfatase ácida e alcalina nos casos em que foram utilizadas doses moderadas e altas (160 e 320 mg/kg). No entanto, 28 dias após o tratamento (estudo de retirada) foi observada recuperação do animal, indicando reversão dos sintomas tóxicos uma vez que o tóxico foi removido.

Entretanto, Wang et al. (2013) ao estudarem a toxicidade do óleo de neem em camundongos, em diferentes doses (177, 533 ou 1600 mg/kg), relataram que a bioquímica sérica e o coeficiente de órgãos nos grupos experimentais não apresentaram diferença significativa.

Com base nas alterações significativas presentes nos valores de creatinina, AST, ALT e FA apenas nos animais do grupo tratado, e uma vez que tais parâmetros são importantes indicadores de lesões hepáticas e renais, sugere-se efeito tóxico possivelmente ocasionado pelo extrato de *A. indica*.

Para realização da avaliação macroscópica e histopatológica os animais foram eutanasiados 14 dias após a inoculação do extrato aquoso *A. indica* (grupo tratado) e água (grupo controle), e os órgãos coletados foram avaliados de acordo com sua coloração, aspecto, tamanho e peso, a fim de diagnosticar se o órgão foi exposto ou não à lesão. O coração, fígado, rim, baço e pulmões são os principais órgãos afetados pela reação metabólica causada pelo agente tóxico. Além das características macroscópicas o peso dos órgãos também é um importante índice do estado fisiológico e patológico dos animais (OA, AL-SHABANAH et al., 2002).

O fígado dos animais tratados apresentou aumento de volume, cor vermelho-acastanhado com áreas levemente pálidas, superfície lisa e dividido em lobos direito e esquerdo. Os rins apresentaram aspecto liso, coloração marrom avermelhada e cobertura capsular de tecido conjuntivo denso dentro da normalidade. O tamanho e a consistência também apresentaram-se dentro da normalidade, formato característico de feijão, unilobulares e com uma borda convexa e outra côncava na qual se situa o hilo. Não foram encontradas alterações no peso dos órgãos do grupo tratado quando comparados ao grupo controle (Tabela 4).

Diferente do presente estudo, Mallick et al. (2013) ao avaliarem o perfil toxicológico da glicoproteína da folha de neem (NLGP) em camundongos e ratos, em diferentes órgãos (fígado, baço, rim, pulmão, linfonodo e cérebro) relatam que não houve alterações macroscópicas significativas entre os grupos tratados e o grupo controle.

Tabela 4: Peso de órgãos de ratos Wistar machos, dos grupos controle e tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica* (2.000 mg/kg), após 14 dias do experimento.

Órgãos	Controle (n=8)	MG 200 (n=8)
Fígado	13,90 ± 1,20a	14,75 ± 2,52a
Rim	1,41 ± 0,17a	1,55 ± 0,20a

Os valores representam a média + E.P.M. dos valores expressos em termos de massa relativa em grama. n – representa o número de animais em cada grupo. Letras diferentes nas colunas ou linhas significam diferenças estatísticas, quando comparados ao grupo controle (Teste t) ao nível de 5% de significância.

Ao exame histológico encontrou-se alterações no grupo tratado com extrato aquoso de *A. indica*, observadas pela vacuolização nos hepatócitos, material hialino e granular no lúmen dos túbulos renais e presença de necrose. Não houve alterações histopatológicas nos animais do grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5: Análise histopatológica dos cortes de fígado e rim de ratos Wistar, dos grupos controle e tratado com extrato aquoso de *Azadirachta indica* (2.000 mg/kg).

Órgão	Achado Histopatológico	Grupo Controle	Grupo Tratado
Fígado	Vacuolização dos Hepatócitos	-	+++
	Material hialino e granular no lúmen dos túbulos renais	-	++
Rim	Presença de necrose	-	++

(-) quando não houver alterações; (+) quando afetar até 30% da área avaliada; (++) quando afetar de 30 a 70% da área; (+++) quando afetar mais de 70% da área avaliada.

A vacuolização difusa e acentuada no citoplasma dos hepatócitos, no grupo tratado pode ser resultante de uma hipoperfusão do tecido, provavelmente ocasionada por uma lentificação do fluxo na microcirculação.

A redução do fluxo na microcirculação causa hipoxia generalizada nas células e por consequência menor produção de ATP levando a parada de funcionamento da bomba de Na/K além de várias bombas iônicas da célula. Na parada da bomba de Na/K, o Na⁺ acumula-se no interior do citoplasma, atraindo água, o que pode ocasionar tal alteração vacuolar (QUEIROZ e PAES, 2021). As principais causas de tal alteração são atribuídas a intoxicação, infecção de caráter agudo, hipopotassemia ou distúrbios circulatórios (MIRANDA, 2008).

As alterações encontradas no histopatológico hepático corroboram com os resultados observados nos parâmetros bioquímicos (AST, ALT, FA), uma vez que mostraram-se significativamente aumentados. As alterações na concentração de ALT, AST e FA são

importantes indicadores de lesões nas células hepáticas (MOTTA, 2003; MILINKOVIC-TUR et al. 2005).

As causas mais frequentes para o aumento das transaminases são as hepatites virais, toxicidade por medicamentos, depósito de gordura no fígado (esteatose) e hepatite autoimune. Já o aumento da FA quando associado com aumento da AST e ALT sugerem patologias a nível de fígado e das vias biliares (MOTTA, 2003).

Lisanti et al. (2018) ao administrarem o extrato das folhas de neem em camundongos machos, por via oral, nas doses 0,25 e 0,50 mg/kg, também verificou degeneração dos hepatócitos do grupo tratado, corroborando com nossos resultados.

Os resultados do estudo de Lisanti et al. (2018) mostram que a administração de extrato aquoso de sementes de neem, causa degeneração das células hepáticas e alterações da morfologia hepática. Segundo Thompson et al. (2017) tais alterações podem ter sido causadas pelos alcalóides pirrolizidínicos (principal conteúdo das plantas de neem) responsáveis por causar efeito hepatotóxico, pelos diterpenóides, que ocasionaram apoptose dos hepatócitos, e pelas catequinas que causam lesão hepatocelular.

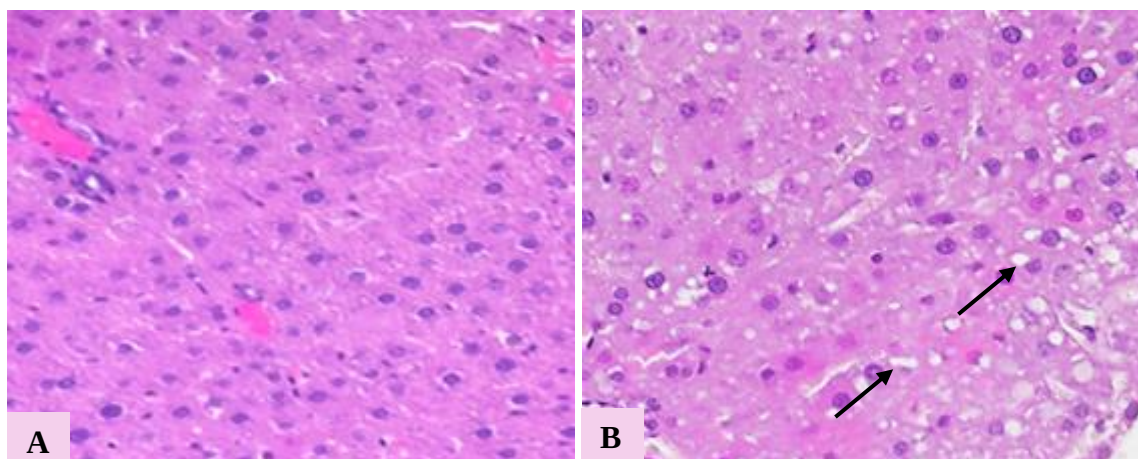


Figura 2: Fotomicrografias dos cortes histológicos de fígado de ratos Wistar machos, dos grupos controle (água) e tratado com o extrato aquoso de *Azadirachta indica* (2.000 mg/kg). (A) Fígado de rato wistar do grupo controle (água), ausência de vacuolização do citoplasma dos hepatócitos. (B) Fígado de rato Wistar tratado com 2000 mg/kg de extrato aquoso de *A. indica*, destacam-se áreas de vacuolização (seta) difusa e acentuada do citoplasma dos hepatócitos (+++). Aumento de 400X, coloração Hematoxilina-Eosina.

A presença de material hialino e granular preenchendo o lúmen dos túbulos renais, acentuada congestão dos vasos sanguíneos do interstício renal e formação significativa de necrose (infecção renal ou pielonefrite) pode ser observada na figura 3.

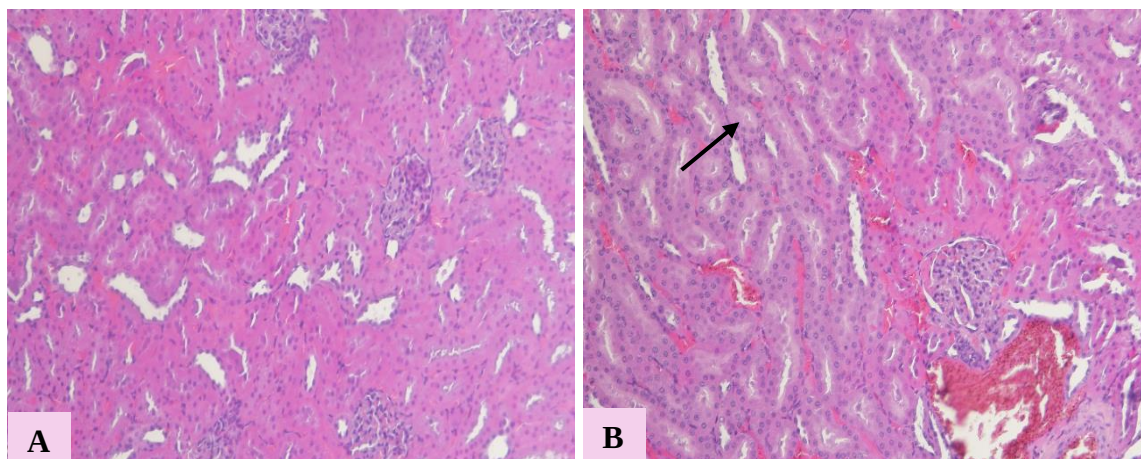


Figura 3: Fotomicrografias dos cortes histológicos de rim de ratos Wistar machos, dos grupos controle (água) e tratado com o extrato aquoso de *Azadirachta indica* (2.000 mg/kg). (A) Rim de rato wistar do grupo controle (água), não apresentou alteração significativa. (B) Rim de rato wistar tratado com 2000 mg/kg de extrato aquoso de *A. indica* por via oral. Acentuada congestão dos vasos sanguíneos do interstício renal. Alguns túbulos apresentam material hialino granular no lúmen (cilindros granulados), assim como células desprendidas (necrose). Aumento de 400X, coloração Hematoxilina-Eosina.

Tais alterações encontradas no histopatológico renal corroboram os resultados observados no parâmetro bioquímico de creatinina, uma vez que a mesma apresentou aumento significativo quando comparado com os valores de referência, indicando deficiência na funcionalidade renal. O composto bioativo Nimbolida, presente na folha da *Azadirachta indica* é relatado na literatura como possível causador das lesões renais (GONZALEZ, 2017).

Em concordância com os achados deste trabalho, Glinsukon et al. (1986) ao administrarem 500 mg/kg de Nimbolida (composto bioativo presente na *Azadirachta indica*) em dose única para camundongos Swiss machos e fêmeas, por via oral, descrevem presença de patologias a nível renal, caracterizando necrose tubular. De acordo com Frank (2022), a necrose tubular é decorrente de lesão tubular e/ou disfunção. A própria substância tóxica pode causar lesão nas células tubulares renais.

Wang et al. (2013) após administrarem óleo de neem em diferentes doses (177, 533 e 1600 mg/kg/dia) em camundongos, puderam observar por meio dos exames histopatológicos alterações no fígado, rins. As doses (177 e 533 mg/kg/dia), respectivamente, mostraram congestão venosa central e sinusóides no lóbulo hepático, degeneração granular e vacuolar discreta nos hepatócitos, enquanto que na dose de 1600 mg/kg/dia, foram observadas congestão venosa central, degeneração granular e vacuolar e cariorrexe nos hepatócitos. Já no rim dos animais dos grupos tratados com as doses menores houve hiperemia capilar do glomérulo e angiectasia intersticial, tumefação das células epiteliais tubulares renais e degeneração granular.

Já na dose de 1600 mg/kg/dia observou-se presença de células inflamatórias maciças, degeneração e necrose.

No entanto, Mallick et al. (2013) ao avaliarem o perfil toxicológico da glicoproteína da folha de nim (NLGP) em camundongos e ratos com diferentes doses de NLGP (25, 50, 100 e 200 µg) descrevem que tanto a avaliação histológica do cérebro, rim, pulmão, fígado, baço e linfonodos quanto o perfil hematológico dos animais apresentaram-se normais, não afetando as funções renais e hepática. Assim como Dorababu et al. (2006) que ao estudarem a toxicidade do extrato aquoso das folhas de *A. indica*, na dose de 1000 mg/kg (dose a baixo do presente estudo), relatam que não foram descritas alterações histológicas no rim e fígado.

Os dados encontrados na avaliação dos parâmetros bioquímicos e histopatológicos em conjunto, indicam hepatotoxicidade e nefrotoxicidade induzida pelo extrato aquoso das sementes de *A. indica* na dose de 2000mg/kg.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a administração do extrato aquoso de *A. indica* na dose de 2.000 mg/kg ocasiona aumento de hemoglobina e leucócitos. Assim como lesões hepáticas e renais confirmadas por alterações histopatológicas e bioquímica, confirmando a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade do extrato aquoso de neem na dose utilizada.

REFERÊNCIAS

- ACHI, N. K. et al. Therapeutic effects of Azadirachta indica A. Juss. leaves in malaria-induced male Wistar rats. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, v. 6, n. 3, p. 191-204, 2018.
- ALZOHAIY, 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- RDC nº26, de 13 de maio de 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf Acesso em: 05 jun. 2021.
- ASHAFA, A. O. T.; OREKOYA, Latifat Olubukola; YAKUBU, Musa Toyin. Toxicity profile of ethanolic extract of Azadirachta indica stem bark in male Wistar rats. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, v. 2, n. 10, p. 811-817, 2012.
- AZEVEDO, G. T. O. S.; NOVAES, A.B.; AZEVEDO, G.B.; SILVA, H.F. Desenvolvimento de Mudanças de Nim Indiano sob Diferentes Níveis de Sombreamento. *Floresta e Ambiente*, v. 22, p. 249-255, 2015.

BOADU, K. O. et al. Toxicological analysis of the effect of neem tree extract in an organism. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Fitoterápicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos> Acesso em: 28/04/2022.

BRASÍLIA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília 2009: Mapa/Acs, 2009. 398 p.

COELHO, M. M. et al. Avaliação hematológica e hepática de ovinos sob tratamento com torta de Neem (*Azadirachta indica*). *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 27, n. 3, 2020.

COSTA, E. M. et al. Extrato aquoso de sementes de nim no controle de *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) em meloeiro. *Revista Ciência Agronômica*, v. 47, p. 401-406, 2016.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Revista Brasileira de farmacognosia*, v. 19, p. 403-411, 2009

DINIZ, M. F. F. M. et al. Padronização dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss e ratos Wistar. *Rev. bras. ciênc. saúde*, p. 171-176, 2006.

DORABABU, D. et al. Efeito do extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre fatores ofensivos e defensivos da mucosa gástrica em ratos. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 50, n. 3, pág. 241, 2006.

DOUGHARI, J. H. Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. Rijeka, Croatia: INTECH Open Access Publisher, 2012.

FAILACE, R. Hemograma: manual de interpretação. Artmed Editora, 2009.

FONTENELE, M. J. S. et al. Árvore neem (*Azadirachta indica* A. Juss): Aspectos positivos, um panorama brasileiro. *Cadernos de Agroecologia*, v. 15, n. 2, 2020.

FRANK O'BRIEN. Necrose tubular aguda (NTA). Washington University in St. Louis. Disponível em: <https://www.msmanuals.com/pt-br/profissional/dist%C3%BArbios-geniturin%C3%A1rios/doen%C3%A7as-tubulointersticiais/necrose-tubular-aguda-nta#:~:text=A%20necrose%20tubular%20aguda%20%C3%A9,menos%20que%20origem%20fal%C3%Aancia%20renal>. Acesso em: 05/03/2022.

GHATULE, R. R. et al. Effect of *Azadirachta indica* leaves extract on acetic acid-induced colitis in rats: Role of antioxidants, free radicals and myeloperoxidase. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 2, p. S651-S657, 2012.

GLINSUKON, T. et al. Acute toxicity of nimbolide and nimbic acid in mice, rats and hamsters. *Toxicology letters*, v. 30, n. 2, p. 159-166, 1986.

GÓIS, R. C. S. et al. Toxicidade reprodutiva da semente de neem (*azadirachta indica* A. Juss.) Em codorna (*coturnix coturnix japonica* linnaeus, 1758) macho: Características seminais, estudo histopatológico e Histomorfométrico do parênquima testicular. 2018.

GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. Introdução à bioquímica clínica animal. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

HAQUE, E. et al. Prophylactic dose of neem (*Azadirachta indica*) leaf preparation restricting murine tumor growth is nontoxic, hematostimulatory and immunostimulatory. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, v. 28, n. 1, p. 33-50, 2006.20.

HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. Biologia e clínica de coelhos e roedores. 1993.

KANAGASANTHOSH, K.; SHANMUGAPRIYAN, S.; KAVIRAJAN, V. Evaluation of acute toxicity, anti-inflammatory activity and phytochemical screening of ethanolic extract of *Azadirachta indica* leaves. *Int. J. Res. Dev. Pharm. Life Sci.* 2015, 4, 1737–1742.

KERR, M. G. Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia. Roca, 2003.

KINGSLEY, O. et al. Avaliação Comparativa Da Atividade Antiplasmodial In Vivo De Extratos Aquosos De Folhas De Carica Papaya, *Azadirachta Indica*, *Magnifera Indica* E Sua Combinação Usando Ratos Balb/C Infectados Com *Plasmodium*. 2012.

KUPRADINUN, Piengchai et al. Toxicity testing of flowers of neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, v. 40, n. 1, p. 47-55, 2010.

LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia plena*, v. 10, n. 3, 2014.

LISANTI, Elsa et al. The effect of aqueous seed extract of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on liver histology of male mice (*Mus musculus albinus*). In: *AIP Conference Proceedings*. AIP Publishing LLC, 2018. p. 060004.

MALLICK, A. et al. Neem leaf glycoprotein is nontoxic to physiological functions of Swiss mice and Sprague Dawley rats: histological, biochemical and immunological perspectives. *International immunopharmacology*, v. 15, n. 1, p. 73-83, 2013.

MILINKOVIĆ-TUR, S. et al. Concentrações de proteínas totais e albuminas e atividades de AST, ALT e GGT no plasma sanguíneo de éguas durante a gestação e início da lactação. *Veterinarski arhiv*, v. 75, n. 3, pág. 195-202, 2005.

MIRANDA, G. M. D. Validação do analisador hematológico automático BC VET® para realização de hemogramas de muare. 2014.

MIRANDA, P. C.; SANTOS, P. C. G. Degeneração hidrópica. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, Garça, n. 10, 2008.

MOTTA, V. T. Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações. Porto Alegre: Médica Missau, 2003.

OA AL-SHABANAH et al. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica*, v. 70, n. 2, p. 135-145, 2002.38.

OLSON, H. et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 32, n. 1, p. 56-67, 2000.

PATEL, S. M. et al. Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. In: *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2016. p. 100-115.

QUEIROZ, L. S.; PAES, R. A. Site didático de Anatomia Patológica, Neuropatologia e Neuroimagem. 2021. Hospedado no Centro de Computação da UNICAMP. Disponível em: <http://anatpat.unicamp.br/neupimportal.html>. Acesso em: 25 abr. 2006.

RAHMAN, M. F.; SIDDIQUI, M. K. J. Biochemical effects of vepacide (from *Azadirachta indica*) on Wistar rats during subchronic exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 59, n. 3, p. 332-339, 2004.

RAMALHO, O. L. F. et al. Cultivo de meliáceas arbóreas no Brasil. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science/Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*, v. 12, n. 2, 2019.

SILVA, V. C. L. Avaliação da toxicidade reprodutiva de ratas Wistar submetidas à ingestão do extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss). 2010. 50 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. 2010.

SOTO, J. C. H. et al. Policitemia e eritrocitose em animais domésticos: Revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*, v. 6, n. 11, p. 1-7, 2008.

STEVENS, K. R.; MYLECRAINE, L. Issues in chronic toxicology. Principles and methods of toxicology, v. 673, 1994.

TEO, S. et al. A 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and l-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. *Toxicology*, v. 179, n. 3, p. 183-196, 2002.

TEPONGNING, R. N. et al. Hydroethanolic extracts of *Erigeron floribundus* and *Azadirachta indica* reduced *Plasmodium berghei* parasitemia in Balb/c mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2018, 2018.

THOMPSON, M.; JAISWAL, Y., Wang, I., & Williams, L. (2017). Hepatotoxicity: treatment, causes and applications of medicinal plants as therapeutic agents. *J Phytopharmacol*, 6(3), 186-193.

WANG, C. et al. A 90-day subchronic toxicity study of neem oil, a *Azadirachta indica* oil, in mice. *Human & experimental toxicology*, v. 32, n. 9, p. 904-913, 2013.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Constatamos que o extrato aquoso de *A. indica* apresentou nefrotoxicidade e hepatotoxicidade quando administrado por via oral na dose de 2.000 mg/kg, e devido às suas importantes propriedades farmacológicas é importante frisar a realização de estudos adicionais que compreendam metodologias diversificadas bem como utilização de doses menores que possam assegurar a utilização da promissora planta em futuras terapias.