

UNILEÃO  
CENTRO UNIVERSITÁRIO DR. LEÃO SAMPAIO  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

ORLANDO DE MENEZES DANTAS JUNIOR

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO  
METANÓLICO OBTIDO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* A. (Nim)**

Juazeiro do Norte - Ceará

2018

ORLANDO DE MENEZES DANTAS JUNIOR

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO  
METANÓLICO OBTIDO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* A.**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, como requisito parcial para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

**Orientador:** Prof<sup>ª</sup>. Esp. Livia Maria Garcia Leandro

Juazeiro do Norte - Ceará

2018

ORLANDO DE MENEZES DANTAS JUNIOR

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL BIOLÓGICO DO EXTRATO  
METANÓLICO OBTIDO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* A.**

Artigo Científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, como requisito parcial para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup>. Esp. Lívia Maria Garcia Leandro

DATA DA APROVAÇÃO: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Esp. Lívia Maria Garcia Leandro

ORIENTADOR

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Vanessa de Carvalho Nilo Bitu

EXAMINADORA 1

---

Prof. Esp. Cícero Roberto Nascimento Saraiva

EXAMINADOR 2

## AGRADECIMENTOS

- **Agradeço primeiramente a Deus por ter me permitido chegar até aqui, e ter me dado forças e paciência durante toda essa jornada.**
- **Aos meus pais por todo esforço e trabalho dedicados a essa conquista, por todo amor, carinho e por todas as horas em claro me esperando retornar.**
- **A toda minha família que mesmo distante sempre me incentivou nessa jornada e que sempre esteve a disposição a me ajudar, em especial minha prima Andressa Evaristo pelas palavras de carinho e incentivos direcionadas a mim.**
- **Aos meus amigos, Dario Ravelli, Yara Silva, Patricia Raquel, Alan Frazão e Rafael Gomes, pelas risadas e noites de diversão tornando essa jornada um pouco menos árdua.**
- **Aos meus sobrinhos Pedro, Arthur, Alexandre, Yan e Nicolas que mesmo sem consciência disso sempre me ajudam em dias difíceis, me mostrando o quanto tenho que me esforçar para ser exemplo para eles.**
- **A todos meus professores que me ensinaram ao decorrer do curso como ser profissional e ético, transmitindo sempre da melhor forma seus conhecimentos, em especial, José Junior, Karollyna Silva, Livia Leandro, Rakel Olinda, e Roberto Nascimento por toda confiança depositada em mim.**
- **Ao meu professor e exemplo de profissional Edinaldo Fagner Ferreira Matias, por me ajudar no desenvolvimento desse trabalho e por me acolher sempre que necessito de ajuda.**
- **A coordenadora do curso de Biomedicina Ana Ruth Grangeiro, por todo apoio dedicado à minha pessoa.**
- **A minha orientadora Livia Leandro, pela dedicação e paciência durante esse mês e por sempre me incentivar e aceitar de bom grado me orientar durante esses meses. ps.: tomara que não tenha se arrependido.**
- **A tia Bruna, por toda paciência durante esses anos por sempre ajudar com minhas dúvidas, sua ética e seu profissionalismo sempre serão meu guia.**
- **Ao Tio Jomar por mesmo sem mal me conhecer me apoiou de forma inacreditável e sempre esteve disposto a me ajudar.**

## PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO EXTRATO METANÓLICO OBTIDO DAS FOLHAS DE *Azadirachta indica* A.

Orlando de Menezes Dantas Junior<sup>1</sup> Livia Maria Garcia Leandro<sup>2</sup>

### RESUMO

O objetivo desse estudo foi de avaliar os componentes contidos no extrato metanólico das folhas obtidas de *Azadirachta indica* A. *Juss* e avaliar o seu potencial anti-hemolítico e hemolítico em eritrócitos humanos. Com a realização da prospecção fitoquímica foi possível observar a presença de metabolitos secundários como: taninos condensados, flavonóis, flavononas e xantonas no extrato metanólico das folhas obtidas de *Azadirachta indica* A. *Juss*. Com relação ao estudo relacionado a toxicidades em *Artêmias salinas* já na concentração de 5ug/mL identificados a DL<sub>50</sub>. No estudo da atividade anti-hemolítica foi observado que o extrato metanólico das folhas obtidas de *Azadirachta indica* A. *Juss* não possui potencial anti-hemolítico, quando observamos nas concentrações 10ug/mL lise das hemácias e na concentração de 100ug/mL lise das hemácias e oxidação da hemoglobina. Contudo ao observar os testes para ação hemolítica encontramos lise das hemácias desde a concentração de 50ug/mL aumentando gradativamente ao aumento das concentrações. Concluímos que o extrato obtido das folhas de *Azadirachta indica* A. *Juss* possui potencial tóxico agudo demonstrado pelos testes de toxicidade, atividade hemolítica e anti-hemolítica levando um alerta a população quanto a segurança do seu uso, contudo havendo a necessidade de mais testes para total elucidação de seu potencial tóxico.

**Palavras-chave:** Anti-hemolítico. *Azadirachta indica*. Hemolítico. Toxicidade.

### PHYCHOCHEMICAL PROFILE AND EVALUATION OF THE TOXICITY OF THE METHANOL EXTRACT OBTAINED FROM THE LEAVES OF *Azadirachta indica* A.

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the non-methanolic extract components of *Azadirachta indica* A. leaf and to evaluate its anti-hemolytic and hemolytic potential in human erythrocytes. The virginia phytochemical prospecting was possible to observe the presence of metabolites such as: condensed tannins, flavonones, flavonones and xanthonas in the methanolic extract of the leaves as being *Azadirachta indica* A.. With the same study related to toxicities in saline solutions already at the concentration of 5ug / mL identified an LD<sub>50</sub>. In the anti-hemolytic millimetry it was observed that *Azadirachta indica* mixed-leaf methanolic extract is not hemolytic, where the concentration of hemoglobin and 10 ug/mL of the erythrocyte and the concentration of 100 µg/mL are observed. oxidation of hemoglobin. Testing for hemoglobin can be performed after an increase of 50µg/mL. Concluded that *Azadirachta indica* leaf extract can be used to test toxicity, hemolytic activity and anti-hemolytic activity with a safety alert for its use elucidation of its toxic potential.

**Keywords:** Anti-hemolytic. *Azadirachta indica*. Hemolytic. Toxicity.

<sup>1</sup> Discente do curso de Biomedicina do Centro universitário Dr. Leão Sampaio. Juazeiro do Norte – CE. E-mail: orlandodm\_fs@hotmail.com

<sup>2</sup> Docente especialista do curso de Biomedicina do Centro universitário Dr. Leão Sampaio. Juazeiro do Norte – CE. E-mail: livialeandro@leaosampaio.edu.br

## 1 INTRODUÇÃO

*Azadirachta indica* A. Juss, conhecida popularmente como Nim indiano, vem sendo utilizada a tempos no Oriente como planta medicinal no tratamento de inflamações, infecções virais, hipertensão e febre (MOSSINI & KEMMELMEIER, 2005). É uma planta de altura relevante, age como repelente e é utilizada para construções, como combustível, lubrificante, fertilizante e, atualmente, como praguicida (LOCKE, 1995; SCHMUTTERER, 1990).

Ainda não foram registrados casos de toxicidade para humanos onde as populações de alguns países consomem seus frutos maduros como África e Caribe. Porém para a utilização dos extratos obtidos com segurança é imprescindível realizar testes que possam verificar seu possível potencial tóxico (MARTINEZ, 2002).

A avaliação *in vitro* da atividade hemolítica e anti-hemolítica, no qual a integridade da célula depende da concentração do meio em que está inserida, que influi sobre a osmose (SHIMODA et al., 2007). Em razão da variação osmótica a célula eritrocitária pode sofrer lise estando diretamente relacionado a fatores intrínsecos como valores ligados a razão área/volume assim como sua forma e tamanho celular também como a fatores extrínsecos sendo que eles são inerentes a membrana (MAEDE, 1980).

Por possuírem uma fragilidade de membrana, os eritrócitos são as principais células utilizadas nos estudos, em que a diferença das osmoralidade, pode haver distensão e lise dos eritrócitos em meio hipotônico, devido ao ganho excessivo de água, bem como em meio hipertônico as células murcham, devido à perda de água para o meio (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2006). Os resultados de perturbações estruturais das células podem ser avaliados pela curva de fragilidade osmótica - FOE, que é obtida através das mudanças de forma das células e da hemólise (RODRIGUES et al., 2009).

Já o bioensaio com *Artemia Salina* é capaz de indicar ações biológicas como toxicidade, ação moluscida, antifúngica, cancerígena e inseticida (ROSA et al., 2016). Os testes de toxicidade mediados por *Artemia Salina* são usados para avaliar a toxicidade de produtos naturais, sendo um método rápido, acessível e seguro.

Usando esse método pode-se encontrar a concentração letal (CL50%) dos elementos presentes em extratos por meio de um simples bioensaio para pesquisar e preliminar a atividade de produtos naturais em meio salino (MEYER, 1982) sendo testes realizados afim de buscar substâncias tóxicas, com isso, avaliar e prever possíveis efeitos em sistemas biológicos (BARBOSA et al.; 2003).

O uso de plantas em preparações caseiras podem causar reações adversas, podendo essas reações derivarem dos compostos da planta utilizado ou pela presença de possíveis contaminantes ou aditivos contidos em compostos oferecidos no comércio (TUROLLO e NASCIMENTO, 2006) contudo a utilização desses produtos deveria passar por testes de segurança e eficácia (TALALAY e TALALAY, 2001).

O uso de produtos naturais no tratamento das patologias é ainda muito utilizado pois as pessoas baseiam tal uso no conhecimento empírico. Além de averiguar uma possível atividade específica das folhas de *Azadirachta indica* A, analisar quanto à segurança do seu uso, que é um parâmetro importante para atestar a viabilidade da introdução de produtos derivados na sociedade.

Entretanto o objetivo do trabalho foi avaliar os potenciais biológicos e químicos do extrato metanólico *Azadirachta indica* A. *Juss* para elucidar seu potencial hemolítico e anti-hemolítico, citotóxicos e tóxico, avaliando a segurança do uso do produto pela população.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 TIPO DE ESTUDO**

O trabalho trata-se de um estudo experimental, de caráter qualitativo e quantitativo, onde os resultados foram submetidos à análise estatística com testes de significância.

### **2.2 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL**

As folhas de *Azadirachta indica* A. foram coletadas no Sítio Bulandeira município de Barbalha, Ceará, Brasil, cidade de clima tropical, durante o mês de dezembro de 2017, por volta das 7h30min. Para identificação do material botânico foi feita uma exsiccata e depositada e depositada no Herbário Dárdamo de Andrade Lima para sua respectiva identificação e confirmação das espécies.

### **2.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS**

As folhas de *Azadirachta indica* A foram submergidas em metanol durante 72 horas, onde foi realizado a pesagem antes e depois da extração, com rendimento bruto de 26,6%. A extração foi realizada no Laboratório de Pesquisa com Produtos Naturais na Universidade Regional do Cariri - URCA. A preparação e obtenção dos extratos e frações foram realizadas

seguindo o método de extração à frio com solventes de diferentes polaridades (BRASILEIRO et al., 2006).

## 2.4 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

A avaliação e identificação das classes de metabólitos secundários presentes no Extrato Metanólico de *Azadirachta indica* A. foram realizadas através da prospecção fitoquímica no laboratório de bioquímica do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio UNILEÃO, onde 300mg do extrato foi pesado e diluído em 30mL de etanol a 70% e distribuído em 5 tubos onde em um dos tubos será adicionado cloreto férrico ( $F_3Cl_3$ ) observando a variação de cor, outros dois tubos será modificando o ph do extrato diluído com (NaOH) e (HCl) e observado variações de cor e formação de precipitado (MATOS, 1997).

## 2.5 ERITRÓCITOS HUMANOS

Os eritrócitos foram cedidos pelo Laboratório Escola de Biomedicina do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio e os documentos para a aprovação do comitê de Ética e Pesquisa foram submetidos ao Sistema Nacional de Ética em Pesquisa (SISNEP) para o registro de pesquisas envolvendo seres humanos. A manipulação e o descarte dos eritrócitos foram realizados de acordo com as Normas de Segurança do Centro Universitário Dr. Leão Sampaio onde foram processadas as amostras.

## 2.6 ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Os eritrócitos foram centrifugados a 2500 rpm por 5' e ressuspensos em NaCl 0,9%. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Várias concentrações do Extrato metanólico das folhas obtida de *Azadirachta indica* A (1 µg, 10 µg, 50 µg, 500 µg, 100 µg e 1000 µg) foram adicionadas a 4mL de uma suspensão de eritrócitos 0,5% (v/v) em NaCl 0,9%. Estas foram incubadas a  $25 \pm 2$  °C por 1 h e centrifugadas a 2500 rpm por 5' novamente. O sobrenadante foi avaliado por espectrofotometria (540 nm) para constatar a hemólise. A hemólise total foi obtida com Triton X-100 e a porcentagem de hemólise foi calculada em relação a esse valor (BARROS et al., 2016). Este experimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos como porcentagem da média aritmética simples.

## 2.7 ATIVIDADE ANTI-HEMOLÍTICA

Os eritrócitos foram centrifugados a 2500 rpm por 5' e ressuspensos em NaCl 0,9%. Esse procedimento foi repetido 3 vezes. Em seguida, foram adicionados 100 µg/mL e 10 µg/mL do extrato metanólico a 4 mL de uma suspensão de eritrócitos 0,5% (v/v) em NaCl 0,9%. Estas foram incubadas a  $25 \pm 2$  °C por 1 h e centrifugadas novamente. Foi desprezado o sobrenadante e ressuspensado os eritrócitos em 2 ml de NaCl nas seguintes concentrações: 0,12%; 0,24%; 0,36%; 0,48%; 0,60%; 0,72%; 0,84% e 0,96%. Estas foram incubadas a  $25 \pm 2$  °C por 1 h e centrifugadas novamente. O sobrenadante foi submetido à espectrofotometria (540 nm) para caracterizar a atividade anti-hemolítica (BARROS et al., 2016). As atividades hemolítica e anti-hemolítica foram realizadas em triplicatas e os resultados serão expressos como média aritmética simples.

## 2.8 TOXICIDADE à *Artemias salina*

### 2.8.1 Preparo da solução teste

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* foi realizado através da adaptação da metodologia de Meyer *et al.* (1982), preparando-se uma solução com sal marinho na concentração de 30 g L<sup>-1</sup>. O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0, por meio de solução 0,1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH. Esta solução foi para eclosão dos ovos de *Artemia salina* e no preparo das demais diluições. Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina por 48 horas, com aeração constante a 25 °C.

### 2.8.2 Preparo dos testes

Cerca de 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para tubos contendo a solução salina e amostras a serem testadas, nas seguintes concentrações do extrato metanólico: 1, 5, 10, 25, 100, 250, 500, 1000 µg/mL extrato bruto das folhas de *Azadirachta indica* A. O ensaio foi realizado em triplicata de amostras, sendo a contagem dos animais mortos e vivos realizada após 24 horas.

Aos dados de porcentagem de larvas de *Artemia salina* mortas, em relação ao aumento da concentração do extrato obtido de folhas de *Azadirachta indica* A, foi ajustado a uma equação linear simples, a qual foi utilizada para estimar a concentração de extrato responsável

por matar 50% das *Artemias* valor representativo da DL<sub>50</sub>. O teste foi acompanhado de um controle negativo, somente com água salina.

### 2.8.3 Análise estatística.

Foi utilizado o método gráfico de análise para obtenção da DL<sub>50</sub> (dose letal do extrato para 50% da população) e tabulado os dados com ajuda do programa *Microsoft Office Excel*, versão 2016.

## 2.9 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Sistema Nacional de Ética em Pesquisa (SISNEP), através da Plataforma Brasil, e terá total obediência à Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes fitoquímicos foi observado a presença dos seguintes constituintes conforme a (Tabela 1) demonstrando presença de taninos condensados, Flavonóis, Flavonas e Xantonas.

**Tabela 1:** Constituintes presentes no Extrato Metanólico das folhas obtidas da *Azadirachta indica* A.

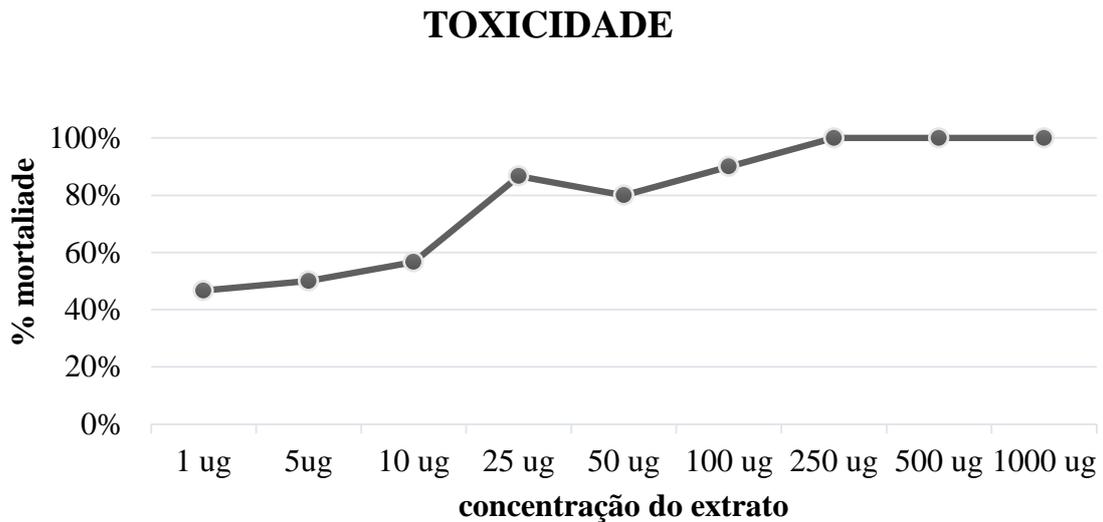
Extratos	Constituintes				
	C1	C2	C3	C4	C5
EMAiA	+	+	+	+	-

EMAiA – Extrato Metanólico de *Azadirachta indica* A.; C1: Taninos Condensados; C2: Flavonóis; C3: Flavononas; C4: Xantonas; C5: Catequinas (taninos catequinos); +: Presente; -: Ausente. Fonte: Própria

Kumar *et al.* (2006) em sua pesquisa encontrou no extrato etanolico da *Azadirachta indica* A. Taninos e Flavonóis corroborando com os encontrados nesse trabalho. Vale ressaltar que os compostos químicos do vegetal podem variar conforme a data da coleta, o solo que foi cultivado e a variação climática do local (SIMÕES, PETROVICK, 2003).

Segundo Meyer et al. (1982) a dose letal média e a toxicidade,  $DL_{50}$ , apresentados por extratos de plantas moduladas por *Artêmias salinas*, os valores são considerados atóxicos dos produtos quando maior que 1000 ug/mL, considera-se então que o extrato metanólico de *Azadirachta indica* A. é tóxico já que apresenta dose letal de 5ug/mL (**Gráfico 1**).

**Gráfico 1.** Toxicidade do Extrato Metanólico das folhas obtidas de *Azadirachta indica* A. modulado por *Artêmia Salina*.

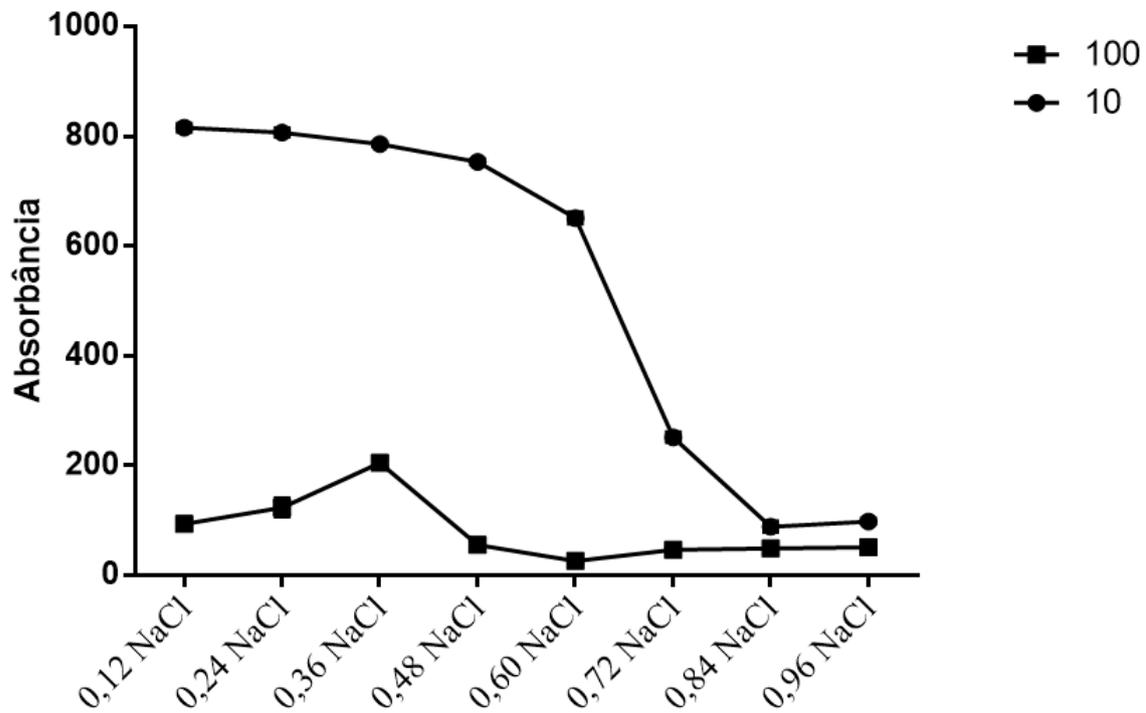


Fonte: Própria

Ashafa, Orekoya e Yakubu (2012), quando realizaram testes de toxicidade em ratos machos Wistar observaram que os animais submetidos a doses diárias do extrato etanólico do caule de *Azadirachta indica* A. aumentou o peso absoluto do fígado, rins e pulmões dos animais, órgãos que estão ligados ao metabolismo do corpo, podendo levar ao comprometimento generalizado de suas funções.

O efeito tóxico da *Azadirachta indica* A. já são conhecidos e corroboram com os resultados encontrados nesse trabalho, Alves (2010) realizou testes com a *Apis melífera* onde utilizou 20 operárias em 6 repetições no qual foram submetidas ao consumo durante toda a vida de partes da *Azadirachta indica* A. e obteve resultados que mostraram que essas abelhas tinham menor tempo de vida e menos taxa de sobrevivência.

**Gráfico 2.** Atividade anti-hemolítica utilizando 10ug/mL e 100ug/mL do Extrato Metanólico das folhas obtidas de *Azadirachta indica* A. modulado por Eritrócitos.



Fonte: Própria

Os testes da atividade anti-hemolítica verificam a capacidade do extrato em proteger os eritrócitos da entrada de água nas células em soluções hipotônicas. O extrato metanólico das folhas obtidas de *Azadirachta indica* A., foi capaz de proteger as hemácias da entrada de água pela sua membrana na concentração de 100 ug/mL.

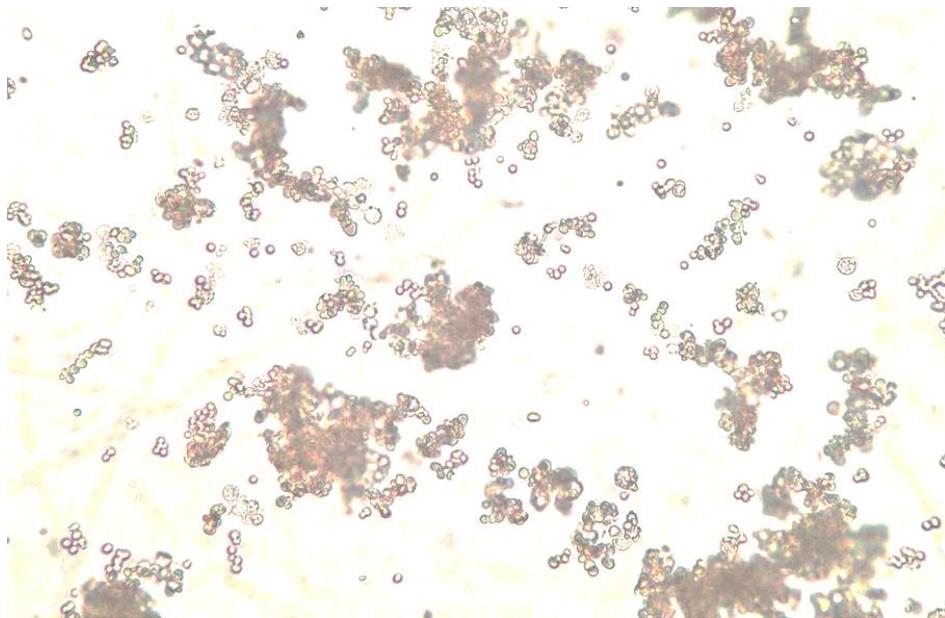
Shabbir, Khan e Saeed, (2013) ao realizar estudos do extrato metanólico de *Maytenus royleanus* e várias frações contra hemácias humanas normais não houve atividade anti-hemolítica mas foi observado atividade hemolítica diferente de acordo com as frações do extrato onde exibiram um padrão diferencial para cada fração exibindo um perfil hemolítico diferenciado.

Os resultados encontrados por Shabbir, Khan e Saeed, (2013) não apresentaram atividade anti-hemolítica em todas as concentrações, mas, apresentaram atividade hemolítica. Na fração de acetato de etila observou-se que a hemólise era mínima, já na fração aquosa apresentou maior atividade hemolítica. Contudo foi observado que o aumento da concentração do extrato ou das frações era inversamente proporcional com o percentual de hemólise apresentado, vendo que quando na concentração de 100ug/mL o extrato teve efeito protetor impedindo a entrada de água na célula,

No (**Gráfico 2**) onde o extrato encontra-se em uma concentração de 10ug/mL e 100ul/mL o resultado das absorvâncias mostrou que as hemácias submetidas a concentração de 100ul/mL demonstra nas absorvâncias das leituras ser menor do que a apresentada no contato dos eritrócitos com uma menor concentração do extrato.

Na busca de explicação do resultado foram feitas lâminas do sedimento dos tubos onde foram observadas hemácias ainda integras com membrana preservada, demonstrando o efeito protetor do extrato em uma concentração mais elevada (**figura 1**).

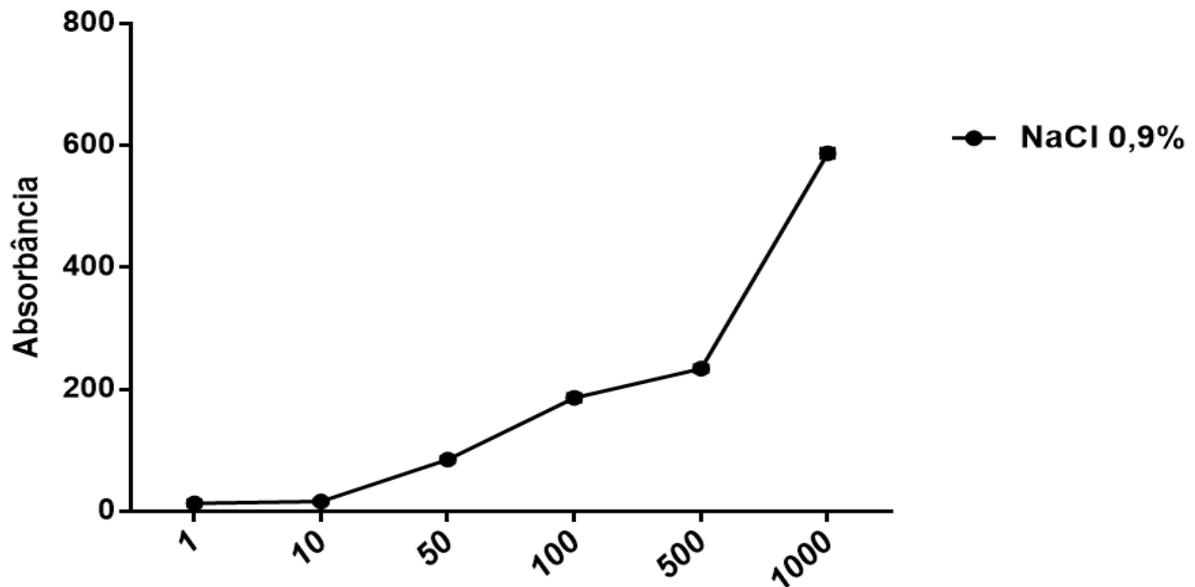
**Figura 1.** Lâmina do sedimento da Citoproteção feita com a concentração de 100ug/mL e NaCl na concentração de 0,36%.



Fonte: Própria

A partir dos resultados encontrados vimos que na concentração de 10ug/mL não apresenta efeito anti-hemolítico no entanto ao aumentar a concentração do extrato observamos o efeito protetor da concentração do extrato em 100ug/mL. Bukowska e Kowalska (2008) asseguram que compostos fenólicos podem causar hemólise por oxidação da hemoglobina, confirmando os resultados encontrados nesse trabalho onde foi observado hemólise e degradação da hemoglobina (**Figura 2**).

**Gráfico 3.** Atividade hemolítica do Extrato Metanólico das folhas obtidas de *Azadirachta indica* A. modulado por Eritrócitos.



Fonte: Própria

A atividade hemolítica em eritrócitos analisa-se o quanto da concentração do produto pode causar hemólise, mantendo os eritrócitos em meio ideal de 0,9% NaCl e acrescentando o produto em diferentes concentrações e verificando o grau de hemólise por espectrofotometria, onde observa-se o aumento gradativo de hemólise ao aumentar a concentração do extrato, observado toxicidade do produto desde as primeiras concentrações e causando danos significantes na célula eritrocitária.

COSTA, et al. (2018) ao realizar o trabalho sobre potencial toxicológico do caule de *Calotropis procera* planta também originária da Índia onde observou que havia ação hemolítica da planta sobre eritrocitos nas concentrações de 100µg/mL e 1000µg/mL, onde esses resultados se assemelham com os deste trabalho.

KALITA, et al. (2011) em seus estudos em busca de atividades hemolíticas causadas por plantas encontrou no extrato metanólico de *Lantana Camara L* planta com efeitos tóxicos já conhecidos na literatura que na o extrato metanólico *Lantana Camara L*. na concentração de 100µg/mL causa hemólise em eritrócitos e quando comparado com os resultados desse estudo verifica-se atividade hemolítica semelhante entre as plantas nas quais extratos usando como solvente o metanol.

## 4 CONCLUSÃO

Conclui-se que apesar de efeitos tóxicos agudos serem apresentados nesse trabalho pela metodologia com utilização de *Artêmias salinas* e a citotoxicidade demonstrada pelas ações hemolíticas e anti-hemolíticas o extrato Metanólico de *Azadirachta indica* A. necessita-se de mais estudos para evidenciar esses efeitos. Surge um alerta quanto ao uso desse produto pela população já que não foi totalmente elucidado quanto a segurança de produtos derivados da planta.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, E. **TOXICIDADE DO NIM (*Azadirachta indica* A. Juss.: Meliaceae) PARA *Apis mellifera* E SUA IMPORTÂNCIA APÍCOLA NA CAATINGA E MATA LITORÂNEA CEARENSE**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ. FORTALEZA-CE. 2010.
- ASHAFA, O. T.; OREKOYA, ; YAKUBU,. Toxicity profile of ethanolic extract of *Azadirachta indica* stem bark in male Wistar rats. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, 2012. ISSN 2(10).
- BARBOSA, J. et al. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – Poluição e Ecotoxicologia Marinha, 2003.
- BARROS, et al. Activity of essential oils of *Piper aduncum* and *Cinnamomum zeylanicum* by evaluating osmotic and morphologic fragility of erythrocytes. **ELSEVIER**, 2016.
- BRASILEIRO, B. G. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, 2006. ISSN 2.
- BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology Letters**, n. 152, 2008.
- COSTA, A. J. et al. AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA E POTENCIAL TOXICOLÓGICO DO CAULE DE *Calotropis procera* (Apocynaceae). **III CONBRACIS**, 2018.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- KALITA, et al. Phytochemical Composition and In Vitro Hemolytic Activity of *Lantana Camara* L. (verbenaceae) Leaves. **Pharmacologyonline**, v. 1, 2011.
- KUMAR, S. et al. Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line. **Jornau Ethnopharmacol**, v. 105, 2006. ISSN 1-2.
- LOCKE, J. C. “Fungi” In: “The Neem Tree”. In **Schmutterer**, 1995.

MAEDE, Y. Studies on feline haemobartonellosis. VI. Changes of erythrocyte lipids concentration and their relation to osmotic fragility. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 42 (3), p. 281-288, 1980.

MARTINEZ, S. S. O. Nim: *Azadirachta indica* – natureza, usos múltiplos, produção. **Instituto agrônomo do Paraná**, Londrina, 2002.

Matos FJ. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: ; 1997.

MEYER, B. N. A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**, 1982.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, 2005. ISSN 1.

ROSA, C. S. et al. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 1-9, 2016. ISSN 1.

SCHMUTTERER, H. Annu. **Entomol.**, v. 35, 1990.

SHABBIR, M.; KHAN, M. R.; SAEED, N. Assessment of phytochemicals, antioxidant, anti-lipid peroxidation and anti-hemolytic activity of extract and various fractions of *Mayternus royleanus* leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2013. ISSN 13.

SHIMODA, E. et al. Efeitos da osmolaridade sobre a motilidade espermática na Piabanha *Brycon insignis*. **Revista ceres**, v. 54, 2007. ISSN 315.

SIMÕES, C. M. O.; PETROVICK, V. R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 2. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS, 2003.

TALALAY, P.; TALALAY, P. **The importance of using scientific principles in the development of medical agents from plants**. [S.l.]. 2001.

TUROLLO, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, 2006. ISSN 2.