

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

EFEITOS TOXICOLÓGICOS AGUDOS DE EXTRATOS DE
FRUTOS VERDES DE *MELIA AZEDARACH* (*MELIACEAE*) EM
RATOS (*Rattus norvegicus*), CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) E
Artemia salina.

Hélio Bernardes Pires Júnior
Orientadora: Profa. Dra. Lígia Miranda de Ferreira Borges

GOIÂNIA
2010

HÉLIO BERNARDES PIRES JÚNIOR

EFEITOS TOXICOLÓGICOS AGUDOS DE EXTRATOS DE
FRUTOS VERDES DE *MELIA AZEDARACH* (MELIACEAE) EM
RATOS (*Rattus norvegicus*), CAMUNDONGOS (*Mus musculus*) E
Artemia salina.

Dissertação apresentada para obtenção do grau
de mestre em Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração

Sanidade Animal

Orientadora

Profa. Dra. Lígia Miranda Ferreira Borges – IPTSP/UFG

Co-orientadores

Prof. Dr. Luiz Carlos da Cunha – NEPET – FF/UFG

Profa. Dra. Andréa Caetano da Silva – IPTSP/UFG

GOIÂNIA

2010

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

P667f Pires Júnior, Hélio Bernardes.
Efeitos toxicológicos agudos de extratos de *Melia azedarach* (MELIACEAE) em ratos (*Rattus norvegicus*), camundongos (*Mus musculus*) e *Artemia salina* [manuscrito] / Hélio Bernardes Pires Júnior. - 2010.
xv, 56 f. : il.

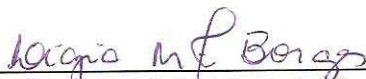
Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Lúgia Miranda Ferreira Borges.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Veterinária, 2010.
Bibliografia.
Inclui lista de figuras e tabelas.

1. Plantas medicinais – Toxicidade 2. Camundongos 3. Ratos
4. Cinamomo – Toxicidade 5. *Melia azedarach* - Extrato I.
Título.

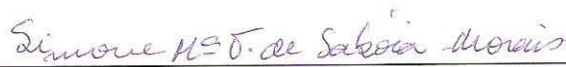
CDU: 633.88:599.323

HÉLIO BERNARDES PIRES JUNIOR

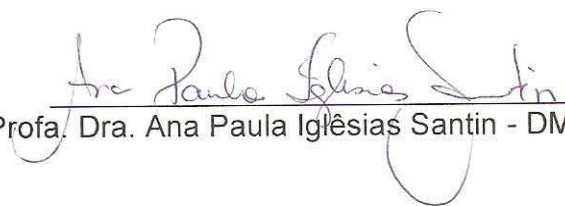
Dissertação defendida e aprovada em **24/02/2010**, pela Banca Examinadora constituída pelos professores:



Profa. Dra. Lúcia Miranda Ferreira Borges
(ORIENTADOR (A))



Profa. Dra. Simone Maria Teixeira de Sabóia - ICB/UFG



Profa. Dra. Ana Paula Iglesias Santin - DMV/EV/UFG

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar e guiar meus passos.

A minha família, meus pais pelos esforços em minha educação, pelo apoio, carinho e confiança em mim.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a Lúgia Miranda Ferreira Borges, minha imensa gratidão por todos estes anos, pelos ensinamentos, paciência e confiança em mim depositado.

Aos eternos amigos do laboratório de Parasitologia Veterinária, que durante todo este período compartilharam momentos importantes de aprendizagem e tornaram nosso trabalho mais alegre e compensador.

Ao professor Luiz Carlos da cunha e todo equipe do NEPET, pelos ensinamentos, auxílio e disponibilidade do biotério para realização dos experimentos.

Ao professor Dr. Ruy de Souza Lino e a Vânia, do Laboratório de Patologia do IPTESP-UFG pela imensa colaboração.

A Lorena, por toda ajuda, durante este árduo caminho percorrido cheio de pedras e redemoinhos, no entanto, devido a sua presença foi fácil e divertido superá-los, obrigado de coração, pelo imenso apoio e amizade.

A Carla, pela colaboração e por ceder seus conhecimentos, de grande auxílio e incentivo em todos os momentos.

Ao programa de pós-graduação em Medicina Veterinária da UFG, pela oportunidade me oferecida.

A Capes pelo apoio financeiro, que tanto auxiliou na realização deste projeto.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1.1 Fortalecimento dos produtos naturais	4
2.1.2 Plantas inseticidas	6
2.1.3 <i>Melia azedarach</i>	8
2.1.4 <i>Melia azedarach</i> no controle de artrópodes	11
2.1.5 Propriedades toxicológicas de <i>M. azedarach</i>	14
2.2 Ensaios toxicológicos	15
2.2.1 Toxicidade aguda	17
2.2.2 Ensaios para irritação dérmica e ocular	18
2.2.3 <i>Artemia salina</i>	19
3. OBJETIVO GERAL	21
3.1 Objetivos específicos	21
4. METODOLOGIA	22
4.1 Local e duração dos experimentos	22
4.2 Material botânico	22
4.3. Avaliação toxicológica de extratos de <i>M. azedarach</i>	22
4.3.1. Toxicidade aguda oral de extratos de <i>M. azedarach</i>	22
4.3.2 Avaliação da irritação dérmica aguda de extratos de <i>M. azedarach</i> ..	25
4.3.3 Avaliação irritação ocular aguda de extratos de <i>M. azedarach</i>	25
4.4 Estudo anatomopatológico	26
4.5 Cultura para obtenção de larvas de <i>Artemia salina</i>	26
4.6 Teste de avaliação da bioatividade de extratos de frutos verdes de <i>M. azedarach</i> frente <i>A. salina</i>	27
4.7 Análise estatística	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Avaliação toxicidade aguda	28
5.2 Avaliação macroscópica	28
5.3 Avaliação Oral e Dérmica em coelhos frente ao extrato hexânico de frutos verdes de <i>M. azedarach</i>	29
5.4 Avaliação histopatológica de <i>M. azedarach</i>	29

SUMÁRIO

5.5 Avaliação toxicológica sobre <i>Artemia salina</i>	30
6. DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÃO	42
8. REFERÊNCIAS.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Melia azedarach</i> , localizada na Escola de Veterinária da UFG.....	9
Figura 2	Administração do extrato de <i>M. azedarach</i> , por gavagem.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valores médios do consumo de ração e consumo de água de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com as doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato de frutos verdes de *Melia azedarach* e animais controle.....32

Tabela 2 Valores médios do consumo de ração e consumo de água de ratos Wistar machos e fêmeas, tratados com as doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato de frutos verdes de *Melia azedarach* e animais controle.....32

Tabela 3 Valores médios do ganho de peso de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com a dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato bruto de frutos verdes de *Melia azedarach* e animais controle.....33

Tabela 4 Valores médios ganho de peso de ratos Wistar machos e fêmeas tratados com a concentração de 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato bruto de frutos verdes de *Melia azedarach* e animais controle.....33

Tabela 5 Peso relativo dos órgãos (g) de camundongos machos controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 300 e 2000 mg/kg.....34

Tabela 6 Peso relativo dos órgãos (g) de camundongos fêmeas controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 300 e 2000 mg/kg.....34

Tabela 7 Peso relativo dos órgãos (g) de ratos machos controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 300 e 2000 mg/kg.....35

Tabela 8 Peso relativo dos órgãos (g) de ratos fêmeas controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 300 e 2000 mg/kg.....35

Tabela 9 Resultados dos exames histopatológicos: número de camundongos machos e fêmeas, controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 300 mg/kg com alterações no pulmão.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 10 Resultados histopatológicos: número de camundongos machos e fêmeas, controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 2000 mg/kg com alterações no pulmão.....36

Tabela 11 Resultados histopatológicos: número de ratos machos e fêmeas, controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 300 mg/kg com alterações nos diferentes órgãos.....37

Tabela 12 Resultados histopatológicos: Número de ratos machos e fêmeas, controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 2000 mg/kg com alterações nos diferentes órgãos.....38

RESUMO

O ressurgimento das pesquisas com inseticidas botânicos deve-se à necessidade de se dispor de novos compostos sem problemas de contaminação ambiental, com menores efeitos residuais e aparecimento de insetos resistentes aos produtos sintéticos. Os fitoquímicos da família *Meliaceae*, tem sido considerados proeminentes pesticidas. Dentre as Meliáceas, uma das plantas que se destaca é *Melia azedarach*. Diversos estudos relatam os efeitos desta planta sobre insetos de importância na saúde pública, agricultura e pecuária. Apesar de *M. azedarach* ser indicada como planta medicinal, seu uso como inseticida natural precisa ser cuidadoso porque a planta contém vários compostos tóxicos para os mamíferos. O objetivo deste trabalho foi verificar a toxicidade do extrato de frutos verdes de *M. azedarach* frente a ratos Wistar, camundongos Swiss e *Artemia salina*, bem como irritação dérmica e ocular em coelhos. Frutos verdes foram colhidos e processados no Departamento de Química da UFG. Para o teste de toxicidade aguda, foi administrado por gavagem o extrato de frutos de *M. azedarach* nas doses de 300 e 2000 mg/kg, em ratos e camundongos de ambos os sexos. Para a avaliação os animais foram observados quanto a presença de sinais clínicos ou morte dos mesmos, durante 14 dias após a administração, posteriormente todos os animais foram eutanasiados e órgãos coletados para realização de análise histopatológica. Dados de consumo de ração e água, ganho de peso e peso dos órgãos também foram analisados. A irritação dérmica e ocular foi avaliada sobre coelhos, utilizando o extrato bruto na pele e no saco conjuntival. O ensaio com *A. salina* foi realizado em oito repetições, nas seguintes diluições, 125, 250, 500 e 1000 µg/ml e um controle não tratado. As placas contendo os grupos foram incubadas no escuro a 25 °C e a leitura feita após 24 horas, contando-se o número de indivíduos sobreviventes. Os resultados obtidos da toxicidade aguda demonstraram que o extrato de *M. azedarach* não provocou mortalidade ou alteração clínica, bem como não houve mudança no ganho de peso, consumo de ração e peso dos órgãos quando comparado tratado e controle. Pelas análises histopatológicas detectou-se algumas alterações principalmente no fígado e pulmão, no entanto estas lesões foram comuns ao tratado e controle. O ensaio realizado em coelhos demonstrou que o extrato não foi irritante na pele ou olho. A CL₅₀ para o extrato de *M. azedarach* foi de 669 µg/ml, obtida no ensaio de *A. salina*, sendo o extrato considerado moderadamente tóxico, para este micro-crustáceo. Apesar destes resultados evidenciarem que o extrato desta planta é seguro para mamíferos, novos estudos como mecanismos de ação desta planta, ensaios de toxicidade sub-aguda e crônica, efeitos sobre organismos específicos e sobre o meio ambiente, são necessários a fim de se definir esta planta como de baixo risco ao ambiente, animais domésticos e ao homem.

Palavras-chave: camundongos, cinamomo, ratos, toxicidade

ABSTRACT

The revival of research involving botanical insecticides owes itself to the need to make available new products devoid of environmental degradation, with lesser residual affects and development of resistant insects to synthetic products. Phytochemicals from the family *Meliaceae* have been considered preeminent pesticides. Among the *Maliaceae*, one of the plants that stands out is *Melia azedarach*. Diverse studies report the effects of this plant on insects of importance in public health, agriculture and livestock sectors. In spite of *M. azedarach* being considered a medicinal plant, its use as a natural insecticide needs to be cautious because the plant contains various toxic components to mammals. The objective of this work was to verify the toxicity of extract from unripe fruits of *M. azedarach* against Wistar rats, Swiss mice and *Artemia salina*, as well as dermal and ocular irritation in rabbits. Unripe fruits were harvested and processed at the Chemistry Department of UFG. For the acute toxicity test, fruit extracts were administered by gavage at doses of 300 and 2000 mg/kg, in rats and mice of both sexes. For evaluation, animals were observed both for the presence of clinical signs or their death for 14 days after the administration, afterwards all the animals underwent euthanasia and their organs collected for use in histopathology analysis. Data on ration and water consumption, weight gain and weight of the organs were also analysed. Dermal and ocular irritation was evaluated on rabbits using a crude extract on the skin and on the conjunctive sac. The bioassay with *A. salina* involved eight repeats in the following dilutions, 125, 250, 500 and 1000 µg/ml and an untreated control. The dishes containing the groups were incubated in the dark at 25 °C and readings taken after 24 hours, by counting the number of surviving individuals. The acute toxicity results obtained demonstrated that the *M. azedarach* extract did not induce mortality or clinical alteration, just as there was no change in weight gain, ration consumption and organs' weight when the treatments and controls were compared. From histopathology analyses, some alterations were detected especially in the liver and lungs, however these lesions were common to the treatments and controls. The assay done in rabbits demonstrated that the extract was not irritative to the skin and eye. The LC₅₀ of the *M. azedarach* extract was 669 µg/ml, as obtained from the *A. salina* assay, the extract being considered moderately toxic to this microcrustacean. In spite of these results to have produced evidence that this plant's extract is safe to mammals, further studies such as modes of action of this plant, sub-acute and chronic toxicity assays, effects on specific organisms and on the environment, are necessary towards the definition of this plant as being of low risk to the environment, domestic animals and to man.

Key words: mice, cinnamon, rats, toxicity

1. INTRODUÇÃO

O crescimento contínuo da população mundial, a diminuição atual de áreas agricultáveis, além das mudanças climáticas, da disputa entre humanos e insetos pelos mesmos alimentos, da resistência desenvolvida por alguns insetos a determinados inseticidas, e o risco crescente de resíduos tóxicos no ambiente e nos alimentos, criam a necessidade de uma obstinada busca de novos inseticidas (LEÃO, 2007).

Entre os pesticidas naturais com potencial já comprovado para o controle de carrapatos, insetos e como planta medicinal, estão àqueles produzidos por espécies da família *Meliaceae*, principalmente *Melia azedarach* (OELRICHS et al. 1983, SOUZA & VENDRAMIM, 2000; BRUNHEROTTO & VENDRAMIM, 2001, BORGES et al, 2003, BORGES et al, 2005).

Diversos estudos relatam os efeitos de *M. azedarach* em insetos de importância na saúde pública, agricultura e pecuária. SALLES et al. (1999), avaliando extratos obtidos de frutos de *M. azedarach* sobre a mosca-das-frutas (*Anastrepha fraterculus*), demonstraram a ação inseticida atuando sobre a redução da postura, desenvolvimento larval e pupal do inseto, bem como mortalidade. Avaliando o efeito de *M. azedarach* em larvas do mosquito *Aedes aegyptii*, MWANGI & REMBOLD, (1988) observaram que o extrato atuava principalmente sobre o desenvolvimento do inseto, além de causar mortalidade larval. A atividade acaricida da *M. azedarach* foi estudada para o controle do ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), sendo que extratos vegetais aquosos demonstraram eficácia de 77,31% no controle do ácaro, evidenciando um bom potencial acaricida (POTENZA, 1999).

Extratos hexânicos do fruto maduro de *M. azedarach* foram testados em fêmeas ingurgitadas e larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Observou-se 98% de mortalidade para larvas, 168 horas após o tratamento. Da mesma forma os extratos hexânicos mostraram alta eficiência (variando de 14 a 100%) contra fêmeas ingurgitadas (BORGES et al., 2003). Testes com bezerros estabulados para se avaliar a eficácia carrapaticida do extrato hexânico do fruto sobre animais infestados artificialmente foram realizados por BORGES et al. (2005), sendo que, a eficácia considerando o número de fêmeas e o seu índice de eficiência reprodutiva, variou de 5 a 69%, com média

de 27%, nos 21 dias após o tratamento. Embora com índices de eficácia não satisfatórios, estes resultados são promissores considerando que não foi utilizada uma formulação carrapaticida adequada. SOUSA et al. (2008) avaliaram diferentes extratos hexânicos obtidos dos frutos, constatando a melhor performance dos frutos verdes no controle do *R. microplus*.

M. azedarach é utilizada como planta medicinal, pois suas folhas e flores são usadas para aliviar dores de cabeça, além de serem utilizados como anti-helmíntico, diurético na Índia e na China (OELRICHS et al., 1983), também é utilizada em doenças de pele, dor estomacal, desordens intestinais, doenças uterinas e cistites (KHAN et al., 2001).

Apesar de *M. azedarach* ser indicada como planta medicinal, seu uso como inseticida natural precisa ser cuidadoso porque a planta contém compostos limonóides conhecidos como meliatoxinas que são tóxicos para mamíferos. Intoxicação por esta planta tem sido observada em animais domésticos e em humanos devido à ingestão de folhas e frutos. Crianças podem morrer após alguns dias se ingerirem de seis a oito frutos. Os sintomas da intoxicação são: náuseas, vômitos, diarreia, sede, suor, ringir dos dentes, sonolência e convulsão (KINGSBURY, 1964; EVERIST, 1974; OELRICHS et al., 1985).

Experimentos conduzidos na Austrália indicaram que a toxicidade das plantas da família *Meliaceae* pode variar de acordo com a área onde crescem e que algumas árvores podem não ser tóxicas (OELRICHS et al. 1985).

O estudo toxicológico é uma avaliação estimada e preliminar das propriedades tóxicas de uma substância teste, que fornece informações acerca dos riscos para a saúde. Para este estudo é comum a utilização de cobaias, sendo as espécies mais utilizadas os ratos, camundongos e coelhos, devido ao seu pequeno porte, sensibilidade, menores quantidades de substância a serem administradas, linhagens isogênicas definidas e características fisiológicas bem conhecidas.

As normas éticas internacionais recomendam o uso criterioso de animais de laboratório e o desenvolvimento de métodos experimentais alternativos. Como exemplo *Artemia salina* é utilizada como indicador de toxicidade de substâncias químicas, pesticidas, poluentes e outros. Utilizando-se a

concentração letal média (CL50) é possível se determinar e avaliar a atividade biológica (toxicidade) de certo composto ou extrato natural.

Diante dos promissores resultados, demonstrando os efeitos carrapaticidas e inseticidas obtidos com *M. azedarach*, da necessidade em formular e comercializar produtos naturais seguros tanto ao homem como aos animais, desenvolveu-se este trabalho, cujos objetivos foram: avaliar a toxicidade do extrato hexânico de frutos verdes de *M. azedarach* através de ensaios preliminares de letalidade utilizando-se o micro crustáceo *A. salina* como organismo teste, e posteriores ensaios de toxicidade em ratos Wistar, camundongos Swiss e coelhos albinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 Fortalecimento dos produtos naturais

O uso de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (VEIGA JUNIOR & PINTO, 2005), assim como a utilização de compostos tóxicos de origem vegetal no controle de pragas (VENDRAMIM & CASTIGLIONI, 2000).

O Brasil, na primeira metade do século XX, foi um grande produtor e exportador de inseticidas vegetais, como a rotenona (extraída das raízes e rizomas de *Lonchocarpus* sp. e *Derris* sp.), piretro (extraído de flores de *Chrysanthemum cinerariifolium*) e nicotina (extraída de folhas de *Nicotiana tabacum*) (MARTINEZ, 2002). Seguindo a tendência mundial, após os anos 50 a 70, passou-se a utilizar os produtos sintéticos como DDT, BHC, Aldrin, Dieldrin e Clordano, que foram usados indiscriminadamente ficando os compostos de origem vegetal praticamente sem uso. Partia-se do pressuposto que um produto que permanecesse bioativo no ambiente por um longo período de tempo seria mais eficaz, na tentativa de afetar várias gerações do inseto-alvo. Entretanto, percebeu-se que a natureza possui enorme capacidade de adaptação e, num processo de seleção natural, estava elegendo os espécimes mais resistentes, trazendo certa ineficiência aos produtos sintéticos utilizados no controle populacional (VIEIRA & FERNANDES, 1999).

Entre as inúmeras consequências negativas do uso de inseticidas sintéticos ao ambiente e à saúde humana, pode-se citar a contaminação do solo, do ar e da água, resultando em intoxicação dos peixes, anfíbios e outros seres. Vale também citar as intoxicações nos humanos e nos animais, tanto no campo, como para o consumidor, a redução da biodiversidade, a redução da população de inimigos naturais, a redução da população e do número de espécies de abelhas e outros polinizadores e ainda a resistência de insetos e artrópodes a esses produtos (MARTINEZ, 2002). Como exemplo, citam-se os piretróides que correspondem a aproximadamente um terço de todos inseticidas comercializados no mundo e causam sérios problemas de intoxicação, como interferência no sistema nervoso central levando à

irritabilidade, insônia, cefaléia, redução da saliva, dermatite alérgica e até mesmo convulsões. Outro aspecto importante é o risco ambiental, já que os piretróides são extremamente tóxicos para os animais de sangue frio, como peixes, répteis e anfíbios (VIEIRA & FERNANDES, 1999).

Portanto, casos documentados de contaminação ambiental e resistência de muitas espécies de pragas a produtos sintéticos incentivaram o desenvolvimento de produtos alternativos. Passou-se então, a entender melhor o processo de interação inseto-planta e desta forma, valorizar mais os mecanismos de adaptação da natureza. Novos produtos passaram a ser planejados e sintetizados buscando maior seletividade, atacando pragas específicas e procurando preservar as demais formas de vida do mesmo habitat, incluindo predadores naturais de insetos-praga, ou seja, estes são produtos sem problemas de contaminação ambiental, resíduos nos alimentos, efeitos prejudiciais sobre organismos benéficos e aparecimento de insetos resistentes (VIEIRA & FERNANDES, 1999; VENDRAMIM & CASTIGLIONI, 2000).

O interesse do segmento industrial por produtos naturais é eminente. O Brasil é o país com maior diversidade genética e vegetal, com mais de 55.000 espécies catalogadas (DIAS, 1996). O mercado para terapia à base de plantas medicinais movimenta em nosso país cerca de US\$ 500 milhões, enquanto na Europa e Estados Unidos no ano de 2000, US\$ 8,5 e 6,3 bilhões, respectivamente (SIMÕES & SCHENKEL, 2002).

Aproximadamente 25% das drogas prescritas mundialmente provêm de plantas. Das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde, 11% são exclusivamente originárias de plantas, como por exemplo: digoxina de *Digitalis* spp. da família Scrophulariaceae, vincristina de *Catharanthus roseus* (L.) entre outras (RATES, 2001).

Entre as principais características dos medicamentos obtidos a partir de fontes naturais é a presença de uma grande variedade de princípios ativos e outras substâncias em uma mesma planta. Os efeitos terapêuticos são provenientes da ação sinérgica destas substâncias ativas, e não das substâncias isoladas (YUNES et al., 2001). Em função destas características o intuito de se estudar plantas inseticidas ocorre na tentativa de se descobrir

novas moléculas que permitam a obtenção de novos inseticidas sintéticos ou obtenção de inseticidas botânicos naturais para uso direto no controle de pragas (VENDRAMIM & CASTIGLIONI, 2000).

Em todo o mundo é crescente o número de pesquisas com plantas que apresentam atividade contra vírus, bactérias, fungos e parasitos, não sendo diferente na medicina veterinária onde as pesquisas por plantas medicinais objetivam a redução de problemas sanitários no controle de várias doenças que comprometem a produtividade dos animais (NIEZEN et al., 1996). Segundo ROEL (2001), os inseticidas naturais são obtidos a partir de recursos renováveis, sendo rapidamente degradáveis; o desenvolvimento da resistência dos insetos a essas substâncias é um processo lento, uma vez que são compostas da associação de vários princípios ativos; não deixam resíduos nos alimentos e, ainda, são de fácil acesso e obtenção pelos agricultores, o que representa um menor custo de produção.

2.1.2 Plantas inseticidas

Plantas com atividade inseticida têm sido utilizadas pelo homem desde tempos remotos, com mais de duas mil plantas com propriedades pesticidas conhecidas (ROEL, 2001). A toxicidade de uma planta contra insetos, não a qualifica necessariamente como um inseticida. Vários aspectos devem ser levados em consideração tais como: forma de extração e conservação dos extratos, eficácia em baixas concentrações, ausência de toxicidade para mamíferos e animais superiores, fácil obtenção, manipulação, aplicação e viabilidade econômica (VIEGAS JUNIOR, 2003)

As plantas inseticidas podem causar diversos efeitos sobre os insetos, como repelência, inibição de oviposição e da alimentação, alterações no sistema hormonal, causando distúrbios no desenvolvimento, deformações, infertilidade e mortalidade nas diversas fases. A extensão dos efeitos e o tempo de ação são dependentes da dosagem utilizada, de maneira que a morte ocorre nas dosagens mais elevadas e os efeitos menos intensos e mais duradouros nas dosagens menores. A utilização de doses subletais causa redução das populações a longo prazo e necessita de menores quantidades de

produtos. As doses letais muitas vezes tornam sua utilização inviável pela grande quantidade necessária (ROEL, 2001).

As plantas possuem em sua composição algumas substâncias denominadas metabólitos primários e secundários. Os primários (lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos) são essenciais à vida e ao desenvolvimento das plantas, sendo fornecedores de matéria-prima e de energia para a formação dos metabólitos secundários como taninos, alcalóides, flavonóides, glicosídeos cianogênicos, dentre outros (NIERO, 2003). Segundo SIMÕES et al. (2002), o aparecimento dos compostos secundários é determinado por necessidades ecológicas (limitações nutricionais, defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra raios UV, atração de polinizadores) e possibilidades biossintéticas, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie. No estudo de plantas com atividade fitoquímica estabeleceu-se que os metabólitos secundários são os responsáveis pelos efeitos tóxicos de determinadas plantas (HODGSON & LEVI, 1997).

Os metabólitos secundários são geralmente armazenados pelas plantas em quantidades menores que os metabólitos primários e tendem a ser sintetizados em células especializadas e em estágios de desenvolvimento distintos, o que muitas vezes dificulta sua extração e purificação. Dessa forma, muitos metabólitos secundários são considerados como materiais especiais ou substâncias químicas refinadas e são mais valorizados no mercado. São utilizados comercialmente como produtos farmacêuticos (terapêuticos, aromatizantes, flavorizantes) e pesticidas. Alguns exemplos de metabólitos secundários são a nicotina, as piretrinas, a rotenona, cocaína, morfina, óleo de rosas, óleo de eucalipto, etc. Os metabólitos secundários geralmente têm estruturas altamente complexas, que determinam sua atividade biológica, sendo sua síntese inviável economicamente. Um bom exemplo é a azadiractina extraída da *Azadirachta indica*, cuja estrutura é bastante complexa (BALANDRIN, 1985).

No Brasil, com o crescimento da agricultura orgânica e agroecológica, muitas plantas com atividade inseticida, vêm sendo utilizadas no controle de insetos na lavoura e criação animal, em substituição aos inseticidas sintéticos. Entre as principais plantas com atividade inseticida destacam-se

aquelas do gênero *Nicotiana* (Solanaceae), produtoras de nicotina e nornicotina; *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* e *Mundulea* (Leguminosae), produtoras de rotenóides, *Chrysanthemum* (Asteraceae), produtoras de piretrinas e *Azadirachta* (Meliaceae), produtoras de azadiractina (VIEIRA & FERNANDES, 1999).

A nicotina é um alcalóide que foi isolado em 1828 e foi largamente utilizado no início do século passado. Junto com a nicotina foram isolados ainda outros alcalóides com atividade inseticida, a nornicotina e anabasina. As nicotinas apresentam algumas desvantagens como alto custo de produção, extrema toxicidade para os animais e o homem e limitada atividade inseticida. A azadiractina é um limonóide de ocorrência restrita a duas plantas, *A. indica* conhecida na Índia como nim e *M. azedarach*, também de origem asiática, mas introduzida em vários países, inclusive o Brasil, onde é conhecida como cinamomo ou santa bárbara, além de várias outras denominações vulgares. A azadiractina tem grande potencial inseticida, sendo considerada como o mais recente inseticida natural (BALANDRIN, 1985, VIEIRA & FERNANDES, 1999).

2.1.3 *Melia azedarach*

As pesquisas envolvendo plantas inseticidas evoluíram muito, sendo o maior destaque dado a *A. indica*. Os resultados verificados com o nim têm estimulado pesquisas com outras plantas da família Meliaceae, no intuito de se encontrar novas espécies com atividade inseticida (BOGORNÍ, 2003). A família Meliaceae compreende 50 gêneros que estão distribuídos predominantemente nos trópicos de todo mundo. São plantas geralmente arbóreas, com folhas alternas compostas e grandes. Os frutos geralmente são secos e as sementes apresentam arilo ou são aladas (SCHULTZ, 1984, JOLY, 2002). No Brasil destacam-se os gêneros *Cabralea*, *Cedrela*, *Guarea*, *Trichilia*, *Melia* e *Azadirachta* (NEEM, 2008).



Figura 1: *Melia azedarach*, localizada na Escola de Veterinária da UFG.
Fonte: Arquivo pessoal

Melia azedarach L., Meliaceae destaca-se como uma das espécies mais estudadas. É uma árvore originária da Índia, Pérsia e Sri Lanka (SILVA JÚNIOR, 1997), e se encontra distribuída em quase todos os países tropicais (BURKS, 1997) (Fig.1). No Brasil, é conhecida popularmente como cinamomo, paraíso, santa-bárbara, jasmin-de-caiena, lilás-da-china, árvore-santa, loureiro-grego, chá-de-soldado, lilás-de-soldado, orgulho-da-índia (LORENZI et al, 2003), além de outras denominações. É uma árvore com altura superior a 10 m, com folhas alternadas, longo-pecioladas, glabras, bipinadas, com folíolos ovais ou lanceolados e agudos. Flores pequenas, em grandes panículas eretas e multifloras, cheirosas, lilases na cor e de anteras amarelas (BRAGA, 1976).

No Brasil é amplamente cultivada, sendo muito utilizada como árvore de sombra. É uma árvore caducifólia, tendo o tronco pardo-acinzentado ou marrom-avermelhado, fissurado longitudinal e obliquamente. Seus frutos são vistosos, globosos e de cor amarelada. É uma planta facilmente diferenciada de outros membros da família Meliaceae pelo aspecto de suas folhas, pendulosas, e com ramos firmes. Uma de suas principais características é a alta produção de folhas e frutos (BURKS, 1997). Grande destaque é dado à qualidade de sua madeira, de cor amarela-brancacenta ou rósea, que é

utilizada na fabricação de móveis, cabos de ferramentas, caixotaria, instrumentos musicais, palitos de fósforo, carroceria e também como combustível (SILVA JÚNIOR, 1997).

Diversas propriedades terapêuticas têm sido atribuídas a *M. azedarach* como atividade antifúngica (CARPINELLA et al., 1999), inseticida (GAJMER et al., 2002), antiviral, antimalárica (KHAN et al., 2001) e anti-helmíntica (MCGRAW et al., 2000; JOSHI & JOSHI, 2000). BARQUERO et al. (1997) relataram que extratos desta planta têm sido usados para várias finalidades médicas, incluindo o tratamento de infecções virais tais como herpes (HSV-1). Suas folhas e flores são usadas para aliviar dores de cabeça, como anti-helmíntico, diurético na Índia e na China (OELRICHS et al., 1983). Também é utilizada em doenças de pele, dor estomacal, desordens intestinais, doenças uterinas, cistites (KHAN et al., 2001) e parasitos gastrintestinais (HAMMOND et al., 1997). CARPINELLA et al. (1999) avaliaram a atividade antifúngica desta planta e relataram que o extrato etanólico obtido de frutos maduros apresentou atividade fungistática e fungicida para diversos fungos patogênicos como *Candida albicans*, *Aspergillus flavus* e *Microsporum canis*. KHAN et al. (2001) avaliaram a atividade antimicrobiana sobre diversos tipos de bactérias, protozoários e fungos como *Bacillus coagulans*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Trichomonas vaginalis*, obtendo resultados satisfatórios.

Estudos fitoquímicos da *M. azedarach* revelam na sua composição diversas substâncias, sendo que muitas delas já tiveram seus efeitos comprovados e outras vêm sendo pesquisadas. Os extratos de folhas e de sementes possuem cerca de quatro compostos ativos, dos quais azadiractina, salanina, meliantriol e nimbina são os principais e possuem comprovada ação inseticida (TAKEYA et al., 1996). A azadiractina interfere no funcionamento das glândulas endócrinas que controlam a metamorfose em insetos, impedindo o desenvolvimento da ecdise, apresentando, ainda, atividade fagoinibidora, além de repelente e inseticida (SIMÕES et al., 2007). As salaninas são triterpenóides que têm sido descritas como compostos biologicamente ativos em insetos (YAMASAKI et al., 1988).

A composição química de cinamomo varia consideravelmente de acordo com região de origem e as regiões onde foram introduzidas, por exemplo,

sementes de *M. azedarach* da Argentina têm carência de meliatoxinas, porém produzem outros triterpenóides que são fortes deterrentes alimentares a insetos-praga e poderiam ser úteis nos seus manejos (CARPINELLA et al., 2003).

Muitas outras substâncias descritas a seguir foram isoladas ainda dessa planta. A casca da raiz e do caule contém 4% de óleo volátil, com 65 a 75% de cinamaldeído e 4 a 10% de eugenol, cumarina, mucilagens, o alcalóide azaradina, esteróis, taninos e lignanos. Os frutos e sementes contêm principalmente óleos, glicerídeos de ácido palmítico, oléico, linolêico e esteárico, melianoninol, melianol, melianona, meliandiol, vanilina, ácido vanílico e azadirachtina. As folhas contêm o alcalóide paraisina, o flavonóide rutina e ainda meliacina (VIEIRA & FERNANDES, 1999).

2.1.4 *Melia azedarach* no controle de artrópodes

Vários estudos descrevem os efeitos de *M. azedarach* sobre insetos de importância na saúde pública, agricultura e pecuária. Em 1946, a utilização de extratos desta planta já era recomendada para a proteção de culturas contra ataque de gafanhotos, no Brasil (LEPAGE et al., 1946). VALLADARES et al. (1999) observaram efeito repelente e inseticida dos extratos de frutos contra ovos e ninfas de *Triatoma infestans*. O extrato etanólico das sementes desta planta foi eficaz contra larvas de *A. aegypti* (WANDSCHEER et al., 2004). CORIA et al. (2007) analisaram o efeito dos extratos obtidos das folhas e dos frutos sobre o *A. aegypti* e verificaram uma atividade tanto larvicida quanto ovicida. SALLES et al. (1999), avaliando extratos obtidos de frutos de *A. indica* e *M. azedarach* sobre a mosca-das-frutas (*Anastrepha fraterculus*), demonstraram a ação inseticida desenvolvida por eles sobre diferentes estágios do inseto tais como, redução da postura e do desenvolvimento larval e pupal, bem como mortalidade.

O extrato aquoso das folhas do cinamomo a 0,1%, afeta a traça-do-tomateiro (*T. absoluta*), tendo-se obtido uma mortalidade de 30% de lagartas (BRUNHEROTTO & VENDRAMIM, 2001). CARVALHO & CASTRO (1987) testaram extratos de cinamomo no controle da vaquinha do feijoeiro, *Diabrotica speciosa*. Os extratos de folhas obtidos por prensagem e extrato aquoso da

polpa de frutos (25 frutos/100ml água) causaram respectivamente, 89% e 97,5% de mortalidade; o extrato de folhas reduziu o consumo alimentar a 8% e o extrato de polpa suprimiu totalmente o consumo alimentar .

SOUZA & VENDRAMIM (2001), ao estudarem a ação de extratos aquosos de diferentes partes de *M. azedarach* sobre ovos de *Bemisia tabaci* biótipo B, concluíram que frutos verdes a 3% causavam mortalidade de 58%, enquanto para as folhas esse índice foi de 47,3%. Sobre as ninfas, o extrato aquoso de frutos verdes alcançou 55,1% de mortalidade, e o de folhas, 35,3%.

A atividade acaricida da *M. azedarach* também foi estudada para o controle do ácaro rajado (*Tetranychus urticae*), considerado um dos ácaros de maior importância em todo o mundo. Extratos vegetais aquosos de *M. azedarach* demonstraram eficácia de 77,31% no controle do ácaro evidenciando um bom potencial acaricida (POTENZA, 1999).

Várias pesquisas vêm sendo realizadas no Brasil no intuito de se comprovar a ação desenvolvida por *M. azedarach* no controle de carrapatos, especialmente o *R. microplus* . BORGES et al. (1994) relataram que o extrato oleoso do fruto desta planta apresentou eficácia de 99,1%; 99,2% e 100,0% para as diluições de 0,25%, 0,50% e 1%, respectivamente, demonstrando que esta planta possui efeito acaricida e que seus extratos poderiam auxiliar no controle deste ixodídeo, fornecendo condições de minimizar problemas com a resistência em várias propriedades rurais.

Extratos obtidos do fruto maduro de *M. azedarach*, utilizando três solventes distintos, hexano, clorofórmio e etanol foram testados sobre fêmeas ingurgitadas e larvas de *R. microplus*. Como resultado observou que todos os extratos testados causaram mortalidade de larvas de *R. microplus*, com maiores taxas de mortalidade nos extratos com clorofórmio (CHCl₃) (100%) e hexano (éter de petróleo) (98%) do que no etanólico (50%), 168 horas após o tratamento. A mortalidade foi dependente da concentração e tempo após o tratamento. Da mesma forma, os extratos hexânico e em CHCl₃ foram mais eficazes (variando de 14 a 100%) contra fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, do que o extrato etanólico (variando de 0 a 46%). Os extratos de *M. azedarach* não mataram as fêmeas, mas inibiram parcialmente ou totalmente a conversão em ovos e a embriogênese (BORGES et al., 2003).

SOUZA (2004) testou o efeito de diversas plantas, entre elas a *M. azedarach*, no controle do carrapato bovino. Na preparação do extrato hidroalcoólico, foram utilizadas 60g de folhas, maceradas em uma solução contendo 500ml de álcool e 500ml de água. Foram testadas três diluições: 1:50; 1:25 e 1:12,5. Não se verificou eficácia significativa do extrato hidroalcoólico das folhas de *M. azedarach* sobre teleóginas de *B. microplus*.

SOUSA et al (2008), avaliando extratos hexânicos obtidos dos frutos verdes e maduros de *M. azedarach*, constataram a melhor performance dos frutos verdes no controle de *B. microplus*.

Testes com bezerros estabulados para se avaliar a eficácia carrapaticida do extrato hexânico do fruto maduro de *M. azedarach*, sobre animais infestados artificialmente, mostrou que a eficácia, considerando o número de fêmeas e o seu índice de eficiência reprodutiva, de acordo com fórmula descrita por DAVEY et al. (2001) variou de -1,6% a 63,6%, com média de 27,3%, 21 dias após o tratamento. Embora com índices de eficácia não satisfatórios, estes resultados são promissores considerando que não foi utilizada uma formulação carrapaticida adequada. (BORGES et al., 2005).

A atuação de um concentrado emulsionável obtido a partir do extrato bruto de frutos verdes de *M. azedarach* sobre larvas e fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*, foi testado por SOUSA (2008) em testes “*in vitro*” e a campo. A transformação do extrato bruto em concentrado potencializou a sua ação “*in vitro*”, registrando altos índices de mortalidade sobre larvas de *R. microplus*, de 100 % nas concentrações de 0,25% a 0,125%. Já no teste de estábulo observou-se que o percentual de controle diário variou de -16,6 % a 89,0 % no grupo tratado com a concentração de 0,5% nos diferentes dias após o tratamento. Entretanto, apesar de promissores resultados o teste a campo não demonstrou os mesmos efeitos sobre a conversão em ovos e a embriogênese conforme observado em laboratório.

Ainda neste mesmo trabalho, avaliando-se uma associação do concentrado emulsionável *M. azedarach* com o fungo *Beauveria bassiana*, foi possível observar um efeito sinérgico da associação da planta com o fungo, com índices de controle variando -14,8% a 87% (média de 40%). Esse resultado foi superior ao encontrado avaliando o concentrado e o fungo separadamente, nas mesmas concentrações. Apesar de não totalmente

satisfatórios, tais resultados são promissores, pois ampliam as possibilidades de novas pesquisas, bem com a utilização do extrato de *M. azedarach* (SOUSA, 2008).

2.1.5 Propriedades toxicológicas de *M. azedarach*

Intoxicações por *M. azedarach* têm sido observadas em animais domésticos e em humanos devido à ingestão de frutos e de folhas, sendo o fruto considerado mais tóxico que as folhas. A toxicidade dos frutos está contida na polpa, na casca e na amêndoa (KINGSBURY, 1964). Segundo WILLIAMS, citado por SILVA JÚNIOR (1997), os frutos maduros são mais tóxicos que os verdes, sendo que a dose letal é de 6g de fruto por kg de peso vivo. MUTTI (1992) afirma que os frutos verdes são mais tóxicos que os maduros, sendo a ingestão de dois a três frutos verdes suficientes para causar sintomas de intoxicação.

Crianças podem morrer após alguns dias se ingerirem de seis a oito frutos de *M. azedarach*, sendo que os sintomas da intoxicação são: náuseas, vômitos, diarreia, hemodiarreias, sede, suor, ringir dos dentes, sonolência e convulsão (EVERIST, 1974; OELRICHS et al., 1985). Apesar disso, estudos realizados na Argentina mostraram que crianças que ingeriram frutos de *M. azedarach* L não se intoxicaram (HURST, 1942).

A intoxicação por *M. azedarach* afeta principalmente os suínos devido à ingestão de frutos, assim como já observado no Brasil (TIMM & RIET-CORREA, 1997). De acordo com KINGSBURY (1964), a dose tóxica para suínos e ovelhas é de aproximadamente 0,5% do peso vivo. Outros animais como bovinos, ovinos, caprinos e aves também são afetados, mas a intoxicação nestes animais parece ser mais rara (MÉNDEZ et al., 2002).

MÉNDEZ et al. (2002) produziram intoxicação experimental em bovinos pela administração de folhas de *M. azedarach*. Folhas verdes de cinamomo foram administradas em dose única a 11 bovinos nas doses de 5 a 30 g/kg de peso vivo. Os sinais clínicos observados foram depressão, atonia ruminal, fezes endurecidas com presença de sangue, incoordenação, tremores musculares, decúbito esternal, hipotermia e dores abdominais. Os sinais clínicos foram observados entre oito e 24 horas após a ingestão e o curso

clínico durou entre duas e 72 horas. Três animais que receberam 30g/kg morreram.

Cães que ingeriram os frutos apresentaram distúrbios gastrintestinais e no sistema nervoso central, culminando com a morte em 36 horas (SILVA JUNIOR, 1997).

Ingestões experimentais e acidentais mostram que os achados de necropsia são inespecíficos, sendo observada acentuada congestão dos intestinos, cérebro, fígado e rim (MÉNDEZ et al., 2002 ; MÉNDEZ et al., 2006). Na histopatologia são descritas alterações degenerativas também no fígado e rim, necrose discreta de linfócitos no tecido linfático, congestão e necrose da mucosa gástrica do intestino delgado e degeneração e necrose dos músculos esqueléticos foram alterações observadas em suínos (MÉNDEZ et al., 2006).

Estudos de intoxicação experimental também foram realizados em coelhos, com frutos de *M. azedarach* e não se observou alteração clínica ou morte de animais. Existe a possibilidade de variação de toxicidade da planta de acordo com a região de ocorrência (BEUTLER et al., 2008), assim como observado na Austrália (OELRICHS, et al. 1985).

SEFFRIN et al. (2006) observaram que extratos aquosos de frutos verdes de *M. azedarach* nas concentrações de 2,5%, 5,0% e 10,0% não causaram mortalidade, sinais clínicos ou alteração dos padrões bioquímicos, na dosagem de até 1 ml/kg/pv sobre ratos Wistar.

Existe uma grande divergência com relação à toxicidade de *M. azedarach*, segundo OELRICHS et al. (1983) a planta contém compostos limonóides conhecidos como meliatoxinas, que são tóxicos para os mamíferos, portanto é necessário aprofundar as pesquisas relacionadas à sua toxicidade aos vertebrados antes de se recomendar sua utilização.

2.2 Ensaio toxicológicos

Existe uma crença popular de que medicamentos com base em plantas são eficazes e seguros, isentos de efeitos colaterais ou qualquer, tipo de toxicidade. Porém a planta medicinal é um xenobiótico e, como todo corpo estranho, os produtos da biotransformação são potencialmente tóxicos (LAPA et al., 2000). Não existe razão para crer na inocuidade dos vegetais, uma vez

que alguns constituintes das plantas apresentam elevada toxicidade, como os digitálicos, alcalóides pirrolizidícos, ésteres de forbol entre outros. Todavia, segundo estudos clínicos controlados, a incidência de efeitos colaterais é menor com produtos fitoterápicos do que com drogas sintéticas (DREW & MYERS, 1997).

SIMOES et al. (1998) relatam algumas espécies vegetais, bem conhecidas popularmente e que apresentam efeitos tóxicos como: confrei - *Symphytum officinale* L., que é hepatotóxico, jurubeba - *Solanum paniculatum* L., que causa irritação gastrointestinal, erva-de-santa-maria - *Chenopodium ambrosioides* L., que afeta o sistema nervoso central, bem como espécies que podem ser letais como a mamona - *Ricinus communis* L.

Toxicologia é o estudo dos efeitos adversos de agentes químicos, físicos ou biológicos, sobre os organismos vivos e o ecossistema, incluindo a prevenção e melhoria de tais efeitos adversos. A capacidade de uma substância causar dano grave ao organismo, ou, até a morte, é considerada como sua toxicidade. Isto ocorre apenas quando há uma interação do agente químico com o organismo, implicado em efeitos ao nível tecidual e celular (DRAIZE et al., 1944). Evidências toxicológicas demonstram que toda substância química é um agente tóxico em potencial, dependendo apenas das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência da administração e via de administração (CASTRO, 1993). Assim, uma planta de uso fitoterápico, deve ser previamente avaliada, sua ação e nível tóxico, a fim de se comprovar cientificamente que é segura (SIMÕES et al., 2004).

A falta de conhecimento sobre a toxicidade de plantas leva a um sério problema de saúde pública. Apenas o uso popular é insuficiente para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. A autorização oficial do uso dos fitoterápicos deve ser fundamentada em evidências experimentais, a fim de se avaliar o risco exposto a sua utilização. (SCHENKEL et al. 1990, VEIGA JUNIOR & PINTO, 2005).

Os testes toxicológicos são realizados para se ter dados sobre as condições em que as entidades químicas produzem efeitos tóxicos, qual a natureza desses efeitos e quais os níveis seguros de exposição (LOOMIS & HAYES, 1996).

No Brasil, a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, em 1996 estabeleceu uma série de normas para regulamentar a avaliação de toxicidade dos fitoterápicos (Portaria nº116 de 08 de agosto de 1996, SV-MS, Brasil, 1996). Atualmente as regras que norteiam os registros e alguns ensaios de toxicidade aguda, subcrônica e crônica, com medicamentos fitoterápicos, estão descritos na Resolução nº 90, de 16 de março de 2004 (BRASIL, 2004).

Por motivos éticos, morais e legais, a obtenção de dados toxicológicos em seres humanos é bastante limitada (WHO, 1993). Assim, as informações toxicológicas pré-clínicas, ou seja, com animais de laboratórios, em condições previamente padronizadas, devem ser avaliadas (MORTON, 1998; BOELSTERLI, 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), muito dos efeitos farmacológicos e tóxicos de drogas observados em animais, podem ter elevado valor de aplicação na espécie humana, sendo explicado o amplo uso de testes tanto no campo farmacológico quanto no toxicológico com o propósito de se determinar tanto a eficácia quanto a segurança do uso destas drogas (WHO, 1978).

Os animais selecionados para um experimento devem ser de espécies e qualidade apropriadas e apresentar boas condições de saúde, utilizando-se o número mínimo necessário para obtenção de resultados válidos. Baseando-se nas facilidades de manutenção e observação, na possibilidade de utilização de um grande número de indivíduos, com ciclos vitais curtos, alta prolificidade, padronização genética e do ambiente de laboratório podemos citar o *Mus musculus* (camundongo) e *Rattus norvegicus* (rato) (COBEA, 1996).

2.2.1 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda avalia os efeitos tóxicos detectados após a administração de um agente em doses únicas ou múltiplas em 24 h, tendo como propósito determinar a sintomatologia em curto prazo após a administração de um composto, bem como o binômio dose-efeito letal, que é estimado por um parâmetro denominado dose letal 50%, mais conhecida com DL_{50} (BARROS & DAVINO, 2003). A DL_{50} é um parâmetro estatístico e

representa a probabilidade de uma dose causar efeito letal em metade da população dos animais em estudo (PAUMGARTTEN et al., 1989).

Por alguns anos a DL_{50} foi amplamente utilizada como base de comparação e classificação da toxicidade de substâncias, tornando-se assim um teste pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana Food and Drug Administration (FDA) responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas (KLAASSEN, 2001). Para a sua realização eram empregados mais de 100 animais para cada espécie estudada e para cada substância testada (VALADARES, 2006).

Em 2002, o teste da DL_{50} foi eliminado e os testes alternativos como dose fixa, toxicidade aguda de classe e teste “up and down”, trouxeram significativa melhora para o bem-estar animal (VALADARES, 2006). O teste de dose fixa tem como princípio identificar a menor dose que cause toxicidade evidente, obtendo a faixa estimada da DL_{50} e sinais de toxicidade (OECD 420). O teste de toxicidade aguda de classe também utiliza o conceito de doses fixas, porém o objetivo final é a mortalidade (OECD 423); enquanto o Teste “up and down” objetiva estimar o valor da DL_{50} testando-se sequencialmente animais individuais, com a dose para cada animal sendo ajustada para cima ou para baixo, dependendo do resultado prévio do animal anterior (OECD 425).

O objetivo destes testes é o de obter informação adequada dos sinais de toxicidade, aproximação dos valores de DL_{50} e em alguns casos, a inclinação da curva dose-resposta. Esses estudos fornecem dados importantes sobre toxicidade e letalidade utilizando menor quantidade de animais que o método clássico de determinação da DL_{50} (HAYES & DiPASQUALE, 2001).

2.2.2 Ensaio para irritação dérmica e ocular

Até meados do século XX, mesmo em países europeus e nos Estados Unidos, não era incomum a comercialização de uma diversidade de produtos que, além de não serem testados quanto a sua eficácia, colocavam em risco a saúde de seus consumidores. A necessidade de um maior controle por parte das agências regulatórias internacionais tornou-se evidente. Foi neste contexto que surgiu, em meados da década de 1940, o teste de irritação ocular de

Draize (DRAIZE *et al.*, 1944). Estes ensaios foram adotados por muitos laboratórios e tornaram-se a base para os métodos oficiais de avaliação de irritação dérmica e ocular (AZEVEDO, 1988; PINTO *et al.*; 2000).

Após a realização de estudos de irritação em várias espécies animais como coelhos, cobaias, camundongos, cães e outros animais, os coelhos foram os animais que apresentaram melhores resultados para verificação de irritação, por possuírem pele permeável, olhos grandes com anatomia e fisiologia bem descrita, fáceis de manusear, economicamente viáveis e de fácil aquisição (DRAIZE *et al.*, 1944; LACHAPELLE, 1994; WILHELMUS, 2001).

O teste de irritação cutânea estabelece graduações para reações como edema e eritema que ocorrem na pele tricotomizada, intacta ou previamente submetida à abrasão. O teste de irritação ocular estabelece graduações para as reações observadas na córnea, íris e conjuntiva. Os protocolos também definem volume, forma de administração, intervalos de observação e número de animais a serem utilizados (PINTO *et al.*; 2000).

Hoje, apesar das duras críticas e de existirem controvérsias quanto à validade de seus resultados, o teste de irritação ocular de Draize permanece preconizado em diretrizes internacionais para avaliação de segurança de substâncias químicas (OECD, 2002) e é o único teste aceito pela entidade regulatória brasileira (ANVISA), para a avaliação do efeito irritante ocular de produtos sujeitos à ação da Vigilância Sanitária.

2.2.3 *Artemia salina*

A. salina é um microcrustáceo da classe *Anostrac*, que vive em águas salinas e salobras de todo mundo. Possuem quatro estágios de desenvolvimento (ovo, náuplio, metanáuplio e adulto) e alguns mecanismos de adaptação que os tornam cosmopolitas, como a osmorregulação, a presença de pigmentos respiratórios como a hemoglobina e a disponibilidade de alternativas reprodutivas que facilitam a dispersão e a perpetuação da espécie (LOPES, 2005). Os bioensaios realizados com este organismo, utilizam o CL₅₀ (Concentração Letal 50 %) como parâmetro de avaliação da atividade biológica (XAVIER, 2005).

O ensaio com *A.salina* é considerado um bom indicador devido ao seu reduzido e específico grau de tolerância a um determinado fator ambiental, de modo que apresente uma resposta nítida em face de pequenas variações na qualidade do ambiente. Tem sido utilizada em testes de toxicidade devido à sua capacidade para formar cistos dormentes, fornecendo, desse modo, material biológico que pode ser armazenado durante longos períodos de tempo (superiores à seis meses) sem perda de viabilidade e sem necessidade de se manter culturas contínuas de organismos-teste, além de ser uma espécie de fácil manipulação (BAROSA et al, 2003).

O custo da implantação e manutenção da cultura de *A. salina* é muito baixo, o que faz desta um excelente modelo experimental, utilizado nas mais diversas áreas da biologia (LOPES, 2005).

Os testes de toxicidade animal, como o bioensaio com *A. salina*, são válidos, pois os efeitos produzidos por um composto nos animais de laboratório são aplicáveis ao homem e aos animais. Com base na dose por unidade de superfície corporal, os efeitos tóxicos no homem estão consideravelmente nos mesmos limites que os observados nos animais de laboratório, sendo possível descobrir possíveis riscos aos humanos (KLASSEN et al., 2001). Este bioensaio consiste na estimativa da concentração de uma substância através da medida de uma resposta biológica, na qual existe apenas um parâmetro envolvido: vida ou morte. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade aguda e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica, sendo atualmente aceito pela comunidade científica (CAVALCANTE et al., 2001).

O primeiro trabalho referente ao uso de *A.salina* em bioensaios foi publicado em 1956 e, a partir daí, inúmeros artigos têm sido reportados na literatura, utilizando-se produtos e toxinas naturais, além de extratos de plantas, e tem sido proposto como teste padrão por Vanhaecke e Persoone (CAVALCANTE et al., 2001).

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade de extratos do fruto verde de *M. azedarach*.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade oral aguda de extrato hexânico do fruto verde de *M. azedarach* em ratos Wistar e camundongos Swiss.
- Avaliar a irritação dérmica aguda de extrato hexânico do fruto verde de *M. azedarach* em coelhos.
- Avaliar a irritação ocular aguda de extrato hexânico do fruto verde de *M. azedarach* em coelhos.
- Avaliar por estudo histopatológico a presença de lesões em órgãos selecionados de ratos Wistar e camundongos Swiss, bem como a biópsia de pele dos coelhos tratados com extrato hexânico do fruto verde de *M. azedarach*.
- Avaliar a toxicidade do extrato hexânico do fruto verde de *M. azedarach* frente a *A. salina*.

4. METODOLOGIA

4.1 Local e duração dos experimentos

O extrato de frutos verdes de *M. azedarach* foi produzido no Instituto de Química da UFG sob a orientação do Professor Dr. Pedro Henrique Ferri e os testes de avaliação toxicológica (realizados com *A. salina* e coelhos albinos) foram realizados nas dependências da Escola de Veterinária. Já o experimento com ratos Wistar e camundongos Swiss foram conduzidos nas dependências da Escola de Farmácia da UFG sob orientação do Professor Dr. Luiz Carlos da Cunha.

4.2 Material botânico

Os frutos verdes de *M. azedarach* foram coletados no Campus II da UFG em Goiânia–GO (latitude 16°41'S; longitude 49°15'W), no mês de fevereiro de 2008, sendo processados neste mesmo mês. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás, sob número de 27.611. Os frutos após serem secos em estufa com circulação e renovação de ar, durante sete dias, foram triturados em moinhos de facas rotativas. Em seguida, submetidos à extração por percolação a frio ou a quente, em Soxhlet, utilizando-se como solvente o hexano. Em seguida, o solvente foi evaporado em um rotavapor. O extrato foi armazenado em geladeira.

4.3. Avaliação toxicológica de extratos de *M. azedarach*

O estudo da toxicidade de extratos de *M. azedarach* foi realizado através da avaliação da toxicidade aguda oral, dérmica e ocular. Todos os estudos seguiram as diretrizes da Organização de Co-operação e Desenvolvimento Econômico (OECD). O experimento foi aprovado pelo comitê de ética da UFG, registrado sob número 107/2009.

4.3.1. Toxicidade aguda oral de extratos de *M. azedarach*

A toxicidade aguda oral seguiu as diretrizes da OECD 423 (OECD, 2001). Os grupos experimentais foram compostos por ratos Wistar pesando de 150 a 200 g e camundongos Swiss pesando de 20 a 25 g, não-isogênicos, provenientes do biotério Central da UFG. Foram utilizados três animais de cada sexo, para cada dose testada, totalizando seis ratos e seis camundongos, mais um grupo controle com o mesmo número de animais. No início do experimento, os animais foram aclimatados no biotério de manutenção do Núcleo de Pesquisa e Estudos Tóxico-farmacológicos da Faculdade de Farmácia da UFG (NEPET-FF/UFG), por dez dias, para se averiguar o comportamento, hábitos alimentares e fisiológicos. Os animais receberam ração (Labina®-Purina) e água *ad libitum*. Os ratos foram acondicionados em bandejas de polipropileno (42 x 34 x 17 cm), sendo três animais por gaiola. Os camundongos foram mantidos em gaiolas de polipropileno (30x20x13 cm), com três animais por gaiola.

Para administração do extrato, os animais foram privados de alimento por oito horas e pesados para ajuste do volume a ser administrado. O extrato de fruto verde de *M. azedarach* foi diluído em DMSO 5% e solução salina, nas concentrações de 300mg/kg e 2000mg/kg, e administrados aos animais por via oral (gavagem), através de uma cânula apropriada (Figura 2).



Figura 2: Administração do extrato de *M. azedarach*, por gavagem em um rato.

Fonte: Arquivo pessoal

A escolha da dose inicial de 300mg/kg, para a avaliação do extrato hexânico de *M. azedarach*, foi baseada no protocolo proposto pela OECD 423 (OECD, 2001), na qual prediz que substâncias não testadas ou com histórico de toxicidade desconhecida, devem-se iniciar as avaliações a partir desta dose. Como não foi observada morte na dose de 300mg/kg, testou-se a dose mais alta, 2000 mg/Kg, recomendada pela OECD 423 (OECD, 2001) (Anexo 1).

No grupo controle foi administrada apenas solução salina e solvente. Os animais foram avaliados aos 30 minutos, 1 h, 2h, 4h, 6h, 12h e 24h e a partir de então diariamente, até o 14º dia após o tratamento. Foram avaliados os seguintes sinais seguindo o “screening hipocrático”: atividade geral, frêmito vocal, irritabilidade, resposta ao toque, resposta ao aperto de cauda, contorção, posição do trem posterior, reflexo de endireitamento, tônus do corpo, força para agarrar, ataxia, reflexo auricular, reflexo corneal, tremores, convulsões, anestesia, lacrimação, ptose, micção, defecação, piloereção, hipotermia, respiração, cianose, hiperemia e morte. Os sinais avaliados na observação comportamental e exame clínico sistemático dos animais foram registrados em protocolo impresso com a lista de sinais a serem investigados (MANOLE, 1977).

Os animais foram pesados a cada três dias, durante os 14 dias de tratamento, para a avaliação do ganho de peso. Além disso, foi medido o consumo de ração (g) e de água (mL).

Todos os ratos e camundongos passaram por eutanásia realizada por um profissional capacitado, de acordo com “os princípios éticos de experimentação animal”, proposta pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 2003). Os animais foram anestesiados (solução xilazina e cetamina 0,2mL/100g, pela via intraperitoneal), e após deslocamento cervical, as cavidades abdominal e torácica foram abertas e registradas todas as alterações macroscópicas. Em seguida, os órgãos como o coração, rins, pulmão, fígado, baço, intestino e cérebro foram coletados e pesados. O peso

relativo dos órgãos foi calculado dividindo-se o peso do órgão pelo peso do animal e multiplicando-se por 100.

4.3.2 Avaliação da irritação dérmica aguda de extratos de *M. azedarach*

A avaliação da irritação dérmica aguda do extrato de *M. azedarach* seguiu as diretrizes da OECD 404 (OECD, 2002).

Três coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), hígidos e adultos jovens foram adquiridos e aclimatados no biotério do Centro de Parasitologia Veterinária da Escola de Veterinária da UFG, por um mês antes do início do experimento. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais, com temperatura local mantida entre 25 ± 5 °C.

Antes da aplicação do extrato de *M. azedarach* sobre a pele, os pêlos da região dorsal do tronco dos animais foram depilados. O extrato (0,5 ml) foi instilado puro e em seguida a área coberta com gaze estéril fixada ao animal com fita adesiva hipo-alérgica. O tempo de exposição ao extrato foi de quatro horas, após este período o extrato foi removido, utilizando-se água.

Foram feitas observações após 60 minutos, 24, 48, 72 horas e diariamente até 14 dias após a retirada do extrato. Os seguintes sintomas foram avaliados: edema, eritema e irritações cutâneas. No sétimo dia foi coletado pele da região tratada e controle, e submetida a exames microscópicos (ANEXO 2).

4.3.3 Avaliação irritação ocular aguda de extratos de *M. azedarach*

A avaliação da irritação ocular aguda do extrato de *M. azedarach* seguiu as diretrizes da OECD 405 (Organisation for Economic Co-operation and Development) (OECD, 2002). Este ensaio somente foi realizado devido ao fato do experimento de irritação dérmica com o extrato de *M. azedarach* não apresentar efeito irritante severo sobre a pele.

Neste estudo foram utilizados coelhos conforme descrito no item anterior. Os dois olhos dos animais selecionados para o ensaio foram

examinados 24 horas antes da aplicação do extrato. Sendo selecionados apenas animais saudáveis e que não apresentaram qualquer lesão ou irritação ocular. O extrato foi aplicado em um dos olhos, no qual após levantar a pálpebra inferior do globo ocular, foi instilado 0,1 mL dentro da bolsa conjuntival. Em seguida as duas pálpebras foram unidas por dez segundos, para evitar a perda do extrato. O outro olho que não recebeu o tratamento serviu como controle. Após 24 horas da instilação do extrato, foi realizada uma lavagem nos olhos dos animais. A duração do período de observação foi de 21 dias após o início do ensaio.

Foram utilizados três animais, adultos e sadios. Os olhos foram examinados 1, 24, 48 e 72 horas após a instilação, no qual foram observadas e classificadas as reações oculares encontradas na conjuntiva (hiperemia, quemose e secreções), córnea (opacidade) e íris (irite) (ANEXO 3).

4.4 Estudo anatomopatológico

Os fragmentos do coração, rins, pulmão, fígado, baço, intestino e cérebro dos ratos e camundongos do grupo tratado e controle, bem como a pele dos coelhos foram fixados em formol a 10% e processados no Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia do IPTESP-UFG, sob orientação do Professor Dr. Ruy de Souza Lino Júnior. Os fragmentos coletados foram incluídos em parafina e, posteriormente, seccionados em cortes de aproximadamente 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina(HE). As alterações teciduais foram avaliadas qualitativamente quanto à presença de distúrbios circulatórios, degenerativos e inflamatórios. A intensidade das alterações foi avaliada como ausente (-), discreto (+), moderado (++) e severo (+++). O exame histológico das lâminas foi realizado em microscopia de luz.

4.5 Cultura para obtenção de larvas de *Artemia salina*

Os cistos de *A. salina* foram adquiridos no comércio e posteriormente incubados (10mg/100ml) em solução marinha sintética (60g sal marinho/litro de

água destilada) conforme MEYER (1982) em um aquário de plástico (35x12 cm). Foram mantidos sob iluminação artificial (lâmpada de 40 W), temperatura constante de 28°C e em estado de saturação de oxigênio com auxílio de uma bomba de ar, por um período de 48 horas. Após este procedimento foi obtido o estágio de metanúplio, modelo padrão para testes de toxicidade devido a sua maior sensibilidade.

4.6 Teste de avaliação da bioatividade de extratos de frutos verdes de *M. azedarach* frente *A. salina*

Utilizou-se a metodologia descrita por MEYER (1982). O extrato de *M. azedarach* foi dissolvido em DMSO 5% e o ensaio foi realizado em oito repetições, utilizando-se as diluições de 125, 250, 500 e 1000 µg/ml e um controle não tratado. Dez metanúplios de *A. salina* foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 1 mL de solução salina. Posteriormente as diluições das amostras foram colocadas nos tubos de ensaios, perfazendo um volume final de cinco mL. No controle foram aplicadas somente solução salina, solvente e as 10 larvas. As placas contendo os grupos controle e tratados foram incubadas no escuro a 25 °C e a leitura feita após 24 horas, contando-se o número de indivíduos sobreviventes. Os valores de CL₅₀-24 h foram calculados de acordo com o programa de análise do probito (PRIPROBIT - SAKUMA, 1998).

4.7 Análise estatística

Os resultados para o ganho de peso, consumo de água e ração, bem como o peso dos órgãos foram expressos através de média ± DP, organizados na forma de tabelas. Para verificar diferenças significativas entre os grupos estudados, foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas através dos testes *T* de Student e teste de Tukey. Para todos os grupos considerou-se resultado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação toxicidade aguda

Na avaliação aguda do extrato hexânico de frutos verdes de *M. azedarach* sobre ratos Wistar e camundongos Swiss na dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg não foi observada morte de nenhum dos animais, no período de 14 dias. Da mesma forma, nenhuma alteração em relação ao *screening* hipocrático foi observada, sendo o comportamento semelhante ao grupo controle em ambas as doses.

Tanto os ratos fêmeas como os machos tiveram consumo de ração semelhante aos seus respectivos controles (Tabela 1). Não houve diferença de consumo de ração do grupo dos camundongos fêmea controle e tratado na dose de 300 mg/kg e de 2000 mg/kg e no grupo tratado macho com 300 mg/kg. Os camundongos machos tratados com 2000 mg/kg apresentaram consumo de ração menor que o controle (Tabela 2).

Sobre as fêmeas, tanto de ratos como de camundongos, o consumo de água foi maior nos grupos tratados com ambas as doses. Nos machos ocorreu o inverso, sendo o consumo de água menor nos grupos tratados, com exceção dos camundongos machos na dose de 2000 mg/kg (Tabelas 1 e 2).

Os resultados de ganho de peso obtidos em ambas as doses avaliadas demonstraram que o grupo tratado ganhou peso após o tratamento e este não diferiu do grupo controle, evidenciando a não influência do extrato neste parâmetro (Tabelas 3 e 4).

5.2 Avaliação macroscópica

As médias relacionadas com o peso relativo dos órgãos de camundongos e ratos, machos e fêmeas, tratados com 300 mg/kg e 2000 mg/kg do extrato de *M. azedarach* estão apresentadas nas tabelas 5, 6, 7 e 8. Não houve diferença significativa entre controle e tratado em ambas às doses, tanto para machos quanto para fêmeas, demonstrando que nenhum dos órgãos avaliados foi alterado pelo tratamento com o extrato. Não foi observada nenhuma alteração macroscópica.

5.3 Avaliação Oral e Dérmica em coelhos frente ao extrato hexânico de frutos verdes de *M. azedarach*.

Na avaliação dérmica, realizada em coelhos, não foi observada a presença de eritema, escaras e de edema. Nenhum dos animais avaliados apresentou qualquer distúrbio clínico ou alteração comportamental.

Já na avaliação ocular, os achados demonstraram a presença de hiperemia em um animal, após 1 hora do tratamento tópico na conjuntiva. Essas alterações regrediram à normalidade, 24 horas após o tratamento, sem apresentar qualquer dano ou seqüela aparente. Nenhum dos animais veio a óbito ou apresentou outra lesão ocular.

5.4 Avaliação histopatológica de *M. azedarach*.

Na avaliação histopatológica de camundongos machos e fêmeas tratados com as doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato de *M. azedarach* não foram encontradas lesões nos baço, coração, encéfalo, fígado, intestino e rins. Alterações pulmonares foram encontradas nos grupos tratados com 300mg/kg, como hiperemia, hemorragia e edema, já o grupo tratado com 2000 mg/kg apresentou apenas hiperemia. Entretanto, os grupos controle também apresentaram lesões pulmonares semelhantes (hiperemia, edema e hemorragia) (Tabelas 9 e 10). Diante do exposto observa-se que o extrato não foi capaz de provocar lesões além daqueles encontradas no grupo não tratado.

Com relação aos ratos tratados com a dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg do extrato de *M. azedarach*, foi observado no exame histopatológico, que estes animais apresentaram mais órgãos acometidos quando comparado aos camundongos, sendo que o coração, encéfalo e intestinos se mantiveram íntegros. Alterações pulmonares como hiperemia, inflamação, hemorragia e edema foram comuns aos grupos tratados e seus respectivos controles, bem como as alterações no fígado (hiperemia e inflamação), rim (hiperemia) e baço (hiperemia). As lesões encontradas nos grupos tratados também foram

observadas no controle, evidenciando que a administração do extrato de *M. azedarach* não interferiu nos resultados encontrados (Tabelas 11 e 12).

No exame microscópico da pele dos coelhos tratados com o extrato de *M. azedarach* foi observada a integridade da epiderme dos três coelhos tratados, sendo que apenas um animal demonstrou a presença de um foco de polimorfonucleados na derme. O grupo controle não apresentou nenhuma alteração. Portanto esses achados corroboram para a negativa do efeito nocivo do extrato, uma vez que a camada mais externa da pele não demonstrou nenhum sinal de irritabilidade frente ao contato direto.

5.5 Avaliação toxicológica sobre *Artemia salina*

Os índices de mortalidade encontrados foram diretamente proporcionais a concentração testada sendo de 3,75% 28,75% 38,75% e 63,75% para os grupos tratados nas concentrações de 125 ug/ml, 250 ug/ml, 500 ug/ml e 1000 ug/ml, respectivamente. Diferença significativa foi observada entre o grupo controle (2,5% de mortalidade) e os grupos tratados com o extrato de *M. azedarach* nas concentrações de 250, 500 e 1000 ug/ml. A CL₅₀ para o extrato de *M. azedarach* foi de 669 ug/ml.

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão do consumo de ração e consumo de água de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com as doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato de frutos verdes de *Melia azedarach* e animais controle.

Tratamento	Fêmea		Macho	
	Consumo de ração	Consumo de água	Consumo de ração	Consumo de água
300 mg/kg	18,28 $\pm$ 3,40a	30 $\pm$ 4,58 a	21,21 $\pm$ 2,15 a	25,92 $\pm$ 2,13 b
Controle	16,5 $\pm$ 1,55a	25,61 $\pm$ 2,46 b	19,92 $\pm$ 0,99 a	27,84 $\pm$ 2,70 a
2000 mg/kg	15,38 $\pm$ 1,40 a	30,71 $\pm$ 1,97 a	16,57 $\pm$ 1,22 b	32,00 $\pm$ 1,56 a
Controle	15,14 $\pm$ 1,29 a	25,28 $\pm$ 0,72 b	20,14 $\pm$ 0,66 a	30,28 $\pm$ 1,72 b

Médias seguidas da mesma letra, não diferem entre si estatisticamente pelo teste de T de Student ($p < 0,05$), em relação ao grupo tratado e controle

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão do consumo de ração e consumo de água de ratos Wistar machos e fêmeas, tratados com as doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato de frutos verdes de *Melia azedarach* e animais controle.

Tratamento	Fêmea		Macho	
	Consumo de ração	Consumo de água	Consumo de ração	Consumo de água
300 mg/kg	47,69 $\pm$ 2,59 a	110,71 $\pm$ 10,35 a	64,30 $\pm$ 4,13 a	111,38 $\pm$ 13,51 b
Controle	46,53 $\pm$ 3,75 a	100,00 $\pm$ 0,00 b	64,38 $\pm$ 1,85 a	122,69 $\pm$ 12,18 a
2000 mg/kg	39,28 $\pm$ 2,70 a	104,29 $\pm$ 7,03a	59,57 $\pm$ 2,34 a	110,71 $\pm$ 12,83b
Controle	39,57 $\pm$ 1,91 a	98,57 $\pm$ 2,34b	60,50 $\pm$ 1,55 a	128,42 $\pm$ 10,78a

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si estatisticamente pelo teste de T de Student ($p < 0,05$), em relação ao grupo tratado e controle.

Tabela 3. Média $\pm$ desvio padrão do ganho de peso de camundongos Swiss machos e fêmeas tratados com a dose de 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato bruto de frutos verdes de *Melia azedarach* e animais controle.

Tratamento	Fêmea	Macho
300 mg/kg	4,66 $\pm$ 1,52	6,30 $\pm$ 0,57
Controle	5,00 $\pm$ 1,73	4,66 $\pm$ 1,15
2000 mg/kg	4,66 $\pm$ 0,57	4,66 $\pm$ 4,5
Controle	4,00 $\pm$ 1,00	8,30 $\pm$ 3,78

Não houve diferença estatística em nenhum dos grupos comparados pelo teste *T* de Student ($p < 0,05$).

Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão do ganho de peso de ratos Wistar machos e fêmeas tratados com a concentração de 300 mg/kg e 2000 mg/kg de extrato bruto de frutos verdes de *Melia azedarach* e animais controle.

Tratamento	Fêmea	Macho
300 mg/kg	33,33 $\pm$ 5,50	42,66 $\pm$ 6,11
Controle	23,00 $\pm$ 10,44	31,66 $\pm$ 3,51
2000 mg/kg	2,33 $\pm$ 4,04	18,00 $\pm$ 13,00
Controle	5,33 $\pm$ 5,13	20,00 $\pm$ 6,24

Não houve diferença estatística em nenhum dos grupos comparados pelo teste *T* de Student ($p < 0,05$).

Tabela 5. Peso relativo dos órgãos (g) de camundongos machos controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 300 e 2000 mg/kg.

Órgão	Controle 1	300 mg/kg	Controle 2	2000 mg/kg
Pulmões	0,54 ± 0,05	0,53 ± 0,07	0,67 ± 0,17	0,71 ± 0,12
Fígado	4,66 ± 0,51	5,30 ± 0,65	5,90 ± 1,09	6,20 ± 0,92
Coração	0,51 ± 0,06	0,46 ± 0,16	0,44 ± 0,04	0,52 ± 0,02
Rins	1,26 ± 0,07	1,44 ± 0,29	1,46 ± 0,08	1,72 ± 0,38
Cérebro	0,93 ± 0,04	1,01 ± 0,13	0,92 ± 0,15	1,15 ± 0,21
Baço	0,29 ± 0,05	0,29 ± 0,15	0,29 ± 0,02	0,31 ± 0,03

Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 6. Peso relativo dos órgãos (g) de camundongos fêmeas controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 300 e 2000 mg/kg.

Órgão	Controle 1	300 mg/kg	Controle 2	2000 mg/kg
Pulmões	0,78 ± 0,37	0,62 ± 0,07	0,85 ± 0,1	0,98 ± 0,03
Fígado	5,83 ± 2,14	5,9 ± 0,36	5,50 ± 0,70	6,02 ± 0,58
Coração	0,56 ± 0,10	0,47 ± 0,02	0,40 ± 0,06	0,39 ± 0,04
Rins	1,21 ± 0,15	1,24 ± 0,09	1,11 ± 0,12	1,16 ± 0,18
Cérebro	1,16 ± 0,07	1,16 ± 0,07	1,24 ± 0,07	1,35 ± 0,02
Baço	0,71 ± 0,73	0,34 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,35 ± 0,05

Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 7. Peso relativo dos órgãos (g) de ratos machos controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 300 e 2000 mg/kg.

Órgão	Controle 1	300 mg/kg	Controle 2	2000 mg/kg
Pulmões	0,67 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,56 ± 0,15	0,75 ± 0,07
Fígado	3,87 ± 0,03	3,73 ± 0,16	3,9 ± 0,17	4,58 ± 0,70
Coração	0,38 ± 0,08	0,29 ± 0,03	0,37 ± 0,03	0,36 ± 0,02
Rins	0,78 ± 0,06	0,77 ± 0,04	0,81 ± 0,06	0,94 ± 0,04
Cérebro	0,64 ± 0,04	0,55 ± 0,07	0,57 ± 0,02	0,61 ± 0,09
Baço	0,25 ± 0,03	0,22 ± 0,05	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,01

Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 8. Peso relativo dos órgãos (g) de ratos fêmeas controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 300 e 2000 mg/kg.

Órgão	Controle 1	300 mg/kg	Controle 2	2000 mg/kg
Pulmões	0,66 ± 0,15	0,63 ± 0,12	0,64 ± 0,04	0,73 ± 0,18
Fígado	3,82 ± 0,57	3,91 ± 0,87	3,72 ± 0,62	3,8 ± 0,61
Coração	0,47 ± 0,09	0,29 ± 0,00	0,32 ± 0,01	0,37 ± 0,05
Rins	1,01 ± 0,38	0,83 ± 0,01	0,80 ± 0,08	0,86 ± 0,14
Cérebro	0,85 ± 0,10	0,84 ± 0,05	0,81 ± 0,08	0,75 ± 0,04
Baço	0,31 ± 0,08	0,24 ± 0,03	0,30 ± 0,02	0,28 ± 0,08

Não houve diferença significativa entre os grupos avaliados pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 9. Resultados dos exames histopatológicos: número de camundongos machos e fêmeas, controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 300 mg/kg com alterações no pulmão (A= ausente/ M= moderado/ D= discreto).

Achados	Fêmea		Macho	
	controle	300 mg/kg	controle	300 mg/kg
Normal	0	0	0	0
Hiperemia	3	3	1	3
Inflamação	1	0	0	0
Hemorragia	1 D	1 D	1 D	0
Edema	1 D	1 D	1 D	0
Polimorfonucleares	1 M	0	0	0

Tabela 10. Resultados histopatológicos: número de camundongos machos e fêmeas, controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 2000 mg/kg com alterações no pulmão (A= ausente/ M= moderado/ D= discreto).

Achados	Fêmea		Macho	
	Controle	2000 mg/kg	Controle	2000 mg/kg
Normal	0	0	0	0
Hiperemia	3 M	3	3 D	3
Inflamação	0	0	0	0
Hemorragia	1 D	0	1 M	0
Edema	0	0	0	0
Polimorfonucleares	0	0	0	0

Tabela 11. Resultados histopatológicos: número de ratos machos e fêmeas, controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 300 mg/kg com alterações nos diferentes órgãos (A= ausente/ M= moderado/ D= discreto).

Pulmão	Fêmea		Macho	
	Controle	300 mg/kg	Controle	300 mg/kg
Normal	0	0	0	0
Hiperemia	3	2	2	3
Inflamação	1	2	0	2
Hemorragia	2	2	1	1
Edema	1	2	1	0
Hiperplasia do tecido linfóide	1	2	1	1
Polimorfonucleares	1	0	0	0
Macrófagos	1	2	0	2
Fígado				
Normal	0	0	0	0
Hiperemia	3 D	3	3	2
Inflamação	0	0	0	1
Rins				
Normal	2	2	3	2
Hiperemia	1 D	1 D	0	1 D
Baço				
Normal	0	0	0	0
Hiperemia	3	3	3	3

Tabela 12. Resultados histopatológicos: Número de ratos machos e fêmeas, controle e tratado com extrato hexânico de frutos verdes de *Melia azedarach*, na dose de 2000 mg/kg com alterações nos diferentes órgãos. (A= ausente/ M= moderado/ D= discreto/).

Pulmão	Fêmea		Macho	
	Controle	2000 mg/kg	Controle	2000 mg/kg
Normal	0	0	0	0
Hiperemia	3	3	2	3
Inflamação	2	3	3	3
Hemorragia	0	0	0	1
Edema	1	0	0	0
Hiperplasia do tecido linfóide	0	3	3	0
Polimorfonucleares	2	0	0	3
Macrófagos	0	1	1	0
Fígado				
Normal	0	0	0	0
Hiperemia	3	3	3	3
Inflamação	1	0	2	2
Rins				
Normal	0	2	1	0
Hiperemia	0	1	1	2
Cilindros hialinos	3	0	1	1
Baço				
Normal	0	0	3	2
Hiperemia	3	3	0	1

6 DISCUSSÃO

O extrato hexânico de frutos verdes de *M. azedarach* demonstrou ser de baixa toxicidade aguda, sugerido pela ausência de sinais clínicos no *screening* toxicológico, assim como ausência de morte durante o período de observação, nos ratos e camundongos tratados com as doses de 300 mg/kg e 2000 mg/kg. Segundo o guia da OECD 423 (OECD, 2001), a toxicidade aguda é a bioatividade capaz de causar efeitos adversos sobre os organismos teste após a administração oral de uma simples dose, em curta duração, evidenciando portanto ausência de efeitos adversos neste estudo.

O extrato de *M. azedarach* se enquadra na Classe 5, pois a estimativa da DL 50 foi superior a 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg, sendo considerado de baixa toxicidade de acordo com o método de classes preconizado pela OECD 423 (OECD, 2001). Não foi testado a dose de 5000 mg/kg, pois o estudo desta dosagem requer casos excepcionais que justifiquem a sua necessidade, além do que a maioria dos trabalhos que utilizam extratos de *M. azedarach* para fins terapêuticos ou como inseticidas, descreve a utilização de pequenas doses. BORGES et al. (2003), encontrou índices de mortalidade de 100% do extrato hexânico de frutos maduros de *M. azedarach*, sobre larvas de *R. microplus* utilizando baixa dosagem (concentração de 0,25 %).

Ao administrar-se o extrato de frutos verdes de *M. azedarach* em ratos Wistar e camundongos Swiss, não se observou alterações clínicas, demonstrando que o extrato desta planta não influenciou a atividade geral e consciência dos animais. Diferentemente do que é descrito por OELRICHS et al., (1985), em que a ingestão de frutos de *M. azedarach* causou sintomas de ordens digestiva e neurológica em animais domésticos, como náuseas, vômitos, diarreia, hemodiarreias, sede, suor, ringir dos dentes, sonolência e convulsão. Entretanto, nossos resultados corroboram com SEFFRIN et al. (2006) que observaram que extratos aquosos de frutos verdes de *M. azedarach* não causaram mortalidade e sinais clínicos nas concentrações de 2,5%, 5,0% e 10,0% com a dosagem de até 1ml/kg sobre ratos Wistar. Resultados semelhantes também foram obtidos por COSTA-SILVA et al. (2008), que avaliando a toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Carapa*

guianensis, planta da mesma família (Meliaceae), demonstraram que as doses de 750 mg/kg e 1.500 mg/kg não produziram sintomas de toxicidade e mortalidade.

Em relação ao ganho de peso os animais tratados apresentaram índices semelhante ao grupo controle, demonstrando que o extrato de fruto verde de *M. azedarach* não alterou os padrões fisiológicos dos animais em estudo. O peso corporal é um dos parâmetros mais empregados em avaliações toxicológicas para indicar o aparecimento, muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal (DIXON, 1989, ZECICK & CLEGG, 1989).

O extrato hexânico de *M. azedarach* não produziu alteração no consumo de ração, exceto no grupo dos camundongos machos tratados na dose de 2000 mg/kg, entretanto apesar de menor consumo, o ganho de peso foi semelhante ao grupo controle. O peso relativo dos órgãos não foi alterado pelo tratamento. Estes resultados enfatizam a não influencia do extrato sobre os parâmetros fisiológicos, uma vez que a toxicidade sistêmica se manifesta através da redução nos consumos de água e ração, alteração comportamental, apatia, má condição de pelagem, alteração da massa relativa dos órgãos (MELO, 2001; GONZALES & SILVA, 2003).

Na análise macroscópica dos órgãos, realizada a partir da necropsia, não foram constatadas alterações no fígado e nos rins, órgãos importantes no metabolismo e excreção de xenobióticos (HAYES & DIPASQUALE, 2001).

A não existência de toxicidade obtida ao avaliar extratos de plantas pode ocorrer devido a fatores inerentes à planta (localidade, fração avaliada, solvente utilizado), bem como os períodos e tipos de avaliação realizados nos estudos de toxicidade. Assim como no presente estudo, resultados semelhantes foram observados por RAIZADA et al. (2001), que avaliaram a toxicidade de um produto comercial a base de azarachtina (AZADIRACHTIN 12%), administrado em ratos machos e fêmeas na dose de 500, 1000 ou 1500 mg/kg/dia durante 90 dias, e não encontraram sinais de toxicidade, mortalidade ou alterações no peso corporal ou parâmetros patológicos. Diferentemente PILLAI & SANTHAKUMARI (1984) que avaliaram outro produto comercial a base de azarachtina (NIMBIDIN), notaram sinais de toxicidade na dose de 2000 mg/kg em camundongos e ratos.

A explicação para esta diferença pode estar relacionada a influências biogeográficas sofridas pelas plantas utilizadas. Tais indícios foram observados para *M. azedarach* por alguns autores que identificaram diferentes compostos em frutos de plantas provenientes de diferentes regiões do mundo (MORGAN & THORNTON, 1973; ARIAS & HIRSCHMAN, 1988; CABRAL et al, 1996). Ainda que orientada pelas características genéticas da planta, a síntese química das substâncias é controlada por fatores do ecossistema, iluminação, calor, constituição do solo, umidade, etc (LAPA, 2000). Segundo HURST (1942) a toxicidade da planta pode variar devido a fatores ambientais como área geográfica, clima e condições de crescimento, sendo que em algumas plantas pode ser totalmente ausente (OERLICHES et al., 1985).

De acordo BEUTLHER et al. (2008) é possível que determinadas variedades da planta apresentem maior toxicidade quando comparadas a outras. Essa diferença provavelmente decorra pelo fato de que as plantas muitas vezes são classificadas apenas quanto à espécie, e não quando a variedade.

Com relação aos ensaios de irritação dérmica e ocular de *M. azedarach* poucos estudos são relatados. Os trabalhos descritos fazem referência ao uso de produtos comerciais à base de nim (*A. indica*), não existindo relatos para extratos experimentais. O produto comercial a base de nim (Margosan-O), não demonstrou efeito irritante sobre olhos ou pele (SCHMUTTERER, 1990), assim como o observado no presente estudo.

Os resultados obtidos na avaliação da concentração letal média necessária para matar 50% dos metanúplios de *A. salina* (DL50%) foi de 669 ug/ml para o extrato hexânico *M. azedarach*. Desta forma, nesta avaliação, o extrato hexânico de frutos verdes de *M. azedarach* pode ser considerado moderadamente tóxico já que são classificadas como tóxicas substâncias com CL50 próximas a zero ug/ml e valores próximos de 1000 são menos tóxicas (MEYER et al., 1982).

Para SEFFRIN et al. (2006) o extrato aquoso de *M. azedarach* não apresenta ação tóxica sobre *A. salina*. Já para MIKOLAJCZAK e REED (1987) que avaliando o extrato de frutos de *M. azedarach* obtido com dois solventes diferentes, concluíram que o extrato hexânico levou a uma maior mortalidade de *A. salina* 48 horas após o tratamento, quando comparado com o extrato

etanólico. Apesar de relatos da literatura apontarem para maior toxicidade do extrato hexânico, em detrimento aos demais solventes, neste estudo com extrato hexânico de *M. azedarach* não foi observado alta toxicidade.

Os resultados do presente estudo são semelhantes aos observados por FARIAS et al, (2008), que avaliando as propriedades farmacológicas do extrato aquoso do nim, encontrou uma CL50 de 617,25 ug/ml.

Em contraste ao observado com o ensaio de toxicidade em ratos e camundongos, que se demonstrou atóxico, o bioensaio frente a *A. salina* causou toxicidade moderada. Sabe-se que *M. azedarach* possui algumas substâncias tóxicas para artrópodes que ainda não foram totalmente elucidadas, e essas substâncias possivelmente seriam responsáveis pela mortalidade do micro-crustáceo, já que são organismos mais simples e sensíveis. Ratos e camundongos são mamíferos e por esta razão, organismos mais complexos com capacidade de metabolizar grande número de princípios ativos, induzindo menor toxicidade. Em contrapartida, são necessários mais estudos sobre o extrato hexânico de frutos verdes de *M. azedarach*, como mecanismos de ação desta planta, ensaios de toxicidade sub-aguda e crônica, efeitos sobre organismos específicos e sobre o meio ambiente, afim de se definir esta planta como de baixo risco ao ambiente, animais domésticos e ao homem.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados desse trabalho conclui-se que:

O extrato bruto obtido de frutos verdes de *M. azedarach* pode ser considerado atóxico quando administrado por via oral em ratos Wistar e camundongos Swiss, já que a DL_{50} estimada, está acima de 2000 mg/kg.

No ensaio de irritação dérmica e ocular o extrato de frutos verdes de *M. azedarach* demonstrou ser não irritante em coelhos.

Em relação a CL_{50} , a taxa de mortalidade de *A. salina* cresceu progressivamente com o aumento da dose do extrato de frutos verdes de *M. azedarach* e a CL_{50} encontrada foi de 669 ug/ml, indicando que este extrato é moderadamente tóxico frente a este micro-crustáceo.

8. REFERÊNCIAS

1. ARIAS, A. R.; HIRSHMANN, C. S. The effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans* bugs. **Fitoterapia**, Milano v.59, n. 2, p. 148-149, 1988.

2. AZEVEDO, J.C. **Avaliação de metodologia alternativa *in vitro* ao teste de irritação ocular de Draize**. 1988. 145 f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
3. BALANDRIN, M. F. et al. Natural Plant Chemical: Sources of Industrial and Medicinal Materials. **Science**, Berlin, v.228, p.1154-60, 1985.
4. BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B., SOUZA, I. **Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina*** – Poluição e ecotoxicologia marinha, Nov. 2003.
5. BARQUERO, A.A.; ALCHK, L.E.; COTO, C.E. Antiviral activity of meliacine on the replication of a thymidine kinase-deficient mutant of Herpes simplex virus type 1 alone and in combination with acyclovir. **International Journal of Antimicrobial Agents**, New York, v.9, p.49-55, 1997.
6. BARROS, S.B.M, DAVINO, S.C. Avaliação da Toxicidade. In: **Fundamentos de Toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p.57-67.
7. BEUTLER, H.P., MAIER, E.M, PETERS, G.B., ROSSATO, C.K. Intoxicação experimental com frutos de *Melia azedarach* em coelhos. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 35., 2008, Gramado. **Anais eletrônicos...** (on line), Gramado: Conbravet, 2008. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0209-1.pdf>. Acesso em 15 nov.2009.
8. BOELSTERLI, U.A. Animal models of human disease in drug safety assessment. **Journal of Toxicological Sciences**, Oxford, v.28, n.3, p.109-121, 2003.
9. BORGES, L.M.F.; SILVA, A.C.; NEVES, B.P. Teste “*in vitro*” de eficácia do cinamomo (*Melia azedarach*, L.) sobre fêmeas ingurgitadas do *Boophilus microplus*, can.(acari:ixodidae). **Revista de patologia tropical**, Goiânia, v.23, n.2, p.175-179,1994.
10. BORGES, L. M. F.; FERRI, P.H.; SILVA, W. J.; SILVA, W. C. In vitro efficacy of extracts of *Melia azedarach* against the tick *Boophilus microplus*. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 17, p. 228-231, 2003.
11. BORGES, L. M. F.; FERRI, P. H.; SILVA, W. C.; SILVA, W. J. Ação do Extrato Hexânico de Frutos Maduros de *Melia azedarach* (Meliaceae) sobre *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bezerros infestados artificialmente. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 34, p.53-59, 2005.

12. BORGONI, P.C. **Efeito de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre o desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) em milho.** Piracicaba, 2003. 65p. Tese (Doutorado)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo.
13. BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará.** 3.ed. Mossoró: ESAM, p.191-192, 1976.
14. BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução – RE nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil**; Brasília, D.F., 18 mar. 2004.
15. BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução – RE nº 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. **Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil**; Brasília, D.F., 16 mar. 2004.
16. BRUNHEROTTO, R.; VENDRAMIM, J. D. Biotividade de Extrato Aquosos de *Melia azedarach* L. Sobre o Desenvolvimento de *tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) em Tomateiro. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 30, n.3, 2001.
17. BURKS, K.C. ***Melia azedarach*. Fact sheet prepared by the Bureau of Aquatic Plant Management.** Tallahassee: Department of Environmental Protection, State of Florida, 1997.
18. CABRAL, M. M. O.; HEINZ REMBOLD, E. S. G.; SIMONE, S. G. D.; KALECOM, A. Anti-moulting activity in Brazilian *Melia azedarach*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, p. 117-118, 1996.
19. CARPINELLA, M. C.; HERRERO, G. G.; ALONSO, R. A.; PALACIOS, S. M. Antifungal activity of *Melia azedarach* fruit extract. **Fitoterapia**, Milano, v. 70, p. 296-298, 1999.
20. CARPINELLA, M.C., DEFAGO, M.T., VALLADARES G., PALACIOS S.M. Antifeedant and insecticide properties of a limonoids from of *Melia azedarach* (Meliaceae) with potential use for pest management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, p.369-374, 2003.
21. CASTRO, J.A. Toxicologia básica mecanismos de toxicidade y SUS aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, La Plata, v.2, p.197-206, 1993.
22. CARVALHO, S.M., DE CASTRO, B.R.R. Efeito de plantas tóxicas no controle da vaquinha *Diabrotica speciosa* Germar em laboratório. In: II Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão, 1987, **Anais...**Goiânia, 1987, p.49.

- 23.CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R., ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.1, p.20-22, 2001.
- 24.COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: H.A. Rothschild, 1996, 259p.
- 25.COBEA. **Princípios éticos na experimentação animal**. Colégio Brasileiro de Experimentação animal. Disponível em: <http://www.ulbra.br/pesquisa/docs/cobea.doc>. Acesso em 10 abr.2009.
- 26.CORIA, C.; ALMIRON, W.; VALLADARES,G.; CARPINELLA, C.; LUDUEÑA, F.; DEFAGO, M.; PALACIOS, S. Larvicide and oviposition deterrent effects of fruit and leaf extracts from *Melia azedarach* L. on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**, Inglaterra, v.99, p.3066-3070, 2007.
- 27.COSTA-SILVA, J.H., LIMA, C.R., SILVA, E.J.R., ARAUJO, A.V., FRAGA, M.C.C.A., RIBEIRO E RIBEIRO, A., ARRUDA, A.C., LAFAYETTE, S.S.L., WANDERLEY, A.G. Acute and subacute toxicity of the Carapa guianensis Aublet (Meliaceae) seed oil. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v.116, p.495-500, 2008.
- 28.DAVEY, J. E.; GEORGE, J. E.; SNYDER, D.E. Efficacy of a single whole-body spray treatment of spinosad, against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle, **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, p 41-52. 2001.
- 29.DIAS, B. F. S. “**A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**”. Campinas: André Tosello, 1996. p.10.
- 30.DIXON, R.L. Toxic responses of the reproductive system. In: HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology**. 2. ed. New York: Raven press, 1989. p.432.
- 31.DRAIZE, J.H.; WOODARG, G.; CALVERY, H.O. Method for study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.82, p.337-90, 1944.
- 32.DREW, A.K.; MYERS, S.P. Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions. **The Medical Journal of Australia**, Sydney, v.166, p.538-541, 1997.
- 33.EVERIST, S.L. Poisonous Plants of Australia. **Angus and Roberts Pty**, Sydney, p. 368-369, 1974.

34. FARIAS, M.R.K.C., **Investigação das propriedades farmacológicas de *Azadirachta indica* A. Juss.** 2008. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
35. GAJMER, T.; SINGH, R.; SAINI, R.K.; KALIDHAR, S.B. Effect of methanolic extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) and bakain (*Melia azedarach*) seeds on oviposition and egg hatching of *Earias vittella* (Fab) (Lep., Noctuidae). **Journal Applied Entomology**, Berlin, v.126, p.238-243, 2002.
36. GONZALEZ, F.H.D., SILVA, S.C., **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária.** Porto Alegre: UFRGS, p.179-198, 2003.
37. HAMMOND, J.A.; FIELDING, D.; BISHOP, S.C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v.21, p.213-228, 1997.
38. HAYES, W. A.; DiPASQUALE, L.C. Acute toxicity and eye irritation. In: HAYES, A.W. **Principles and Methods of Toxicology.** 4. ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001.
39. HODGSON, E.; LEVI, P. E. **A textbook of modern toxicology.** 2. ed. Stamford: Appleton & Lange, 1997. 496 p.
40. HURST, E. **Poisonous plants of New South Wales.** Plants Committee, NSW, Sydney, 1942. 342p.
41. JOLY, B. A. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal.** São Paulo: Editora Nacional, 2002, 777p.
42. JOSHI, A.R.; JOSHI, K. Indigenous knowledge and uses on medicinal plants by local communities of the kali gandaki watershed area, Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.73, p.175-183, 2000.
43. KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Horsfieldia helwiigi* and *Melia azedarach*. **Fitoterapia**, Milano, v. 72, p.423-427, 2001.
44. KINGSBURY, J. M. Poisonous Plants of the United States and Canada. **Prentice-Hall**, Englewood Cliffs, p. 206-208, 1964.
45. KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Casarett & Doull's: Toxicologia, a ciência básica dos tóxicos.** Compêndio. 5. ed., Portugal: Mc Graw-Hill, 2001.
46. LACHAPELLE, J.M. (1994) Toxicidade orgânica e geral. In: Pruniéras, M. **"Manual de Cosmetologia - e Dermatológica"**, 2. ed. São Paulo: Andrei , p. 325-56.

47. LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; GODINHO, R.O.; LIMA, T.C.M. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMOES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.M.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2. Ed. Porto Alegre: UFRGS, 2000. cap.11, p.181-196.
48. LEAO, J.D.J. **Bioatividade de Extratos Vegetais no Controle de *Sitophilus oryzae* (LINNE, 1763) em Arroz**. 2007. 91 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
49. LEPAGE, H. S.; GIANOTTI, O. & ORLAND, A. Proteção das culturas contra os gafanhotos por meio de extratos de *Melia azedarach*. **O Biológico**, São Paulo, v.12, p.265-271, 1946.
50. LOOMIS, M.D.; HAYES, A.W. **Loomis essentials of toxicology**. 4 ed. California: academia press, 1996.
51. LOPES, W. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE TOXICOLOGIA. 2005, Recife. **Resumos...** 2005. p.92.
52. LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; TORRES, M. A. V.; BACHER, L. B. **Árvores exóticas do Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, p.234-368, 2003.
53. LUCIO, E.M.R.A, ROSALEN, P.L., SHARAPIN, N., SOUZA BRITO, A.R.M. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de farmacognosia**, São Paulo, v.9, n.10, p.23-25, 2000.
54. MALONE, M. H. – Pharmacological approaches to natural product, screening and evaluation. In: **New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity**. Berlin: H. Wagner, Wolf Springer–Verlag, 1977.
55. MARTINEZ, S. S. O NIM - Natureza, usos múltiplos, produção. **IAPAR**, Londrina, 2002. p.142.
56. MCGRAW, L.J.; JÄGER, A.K.; van STADEN, J. Antibacterial, anthelmintic and antiamebic activity in South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.72, p.247-263, 2000.
57. MELO, F.B., **Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. 2001, 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Escola de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

- 58.MENDEZ, M. C. et al. Experimental intoxication by leaves of *Melia azedarach* (Meliaceae) in cattle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v.22, n.1, p.19-24, jan./mar. 2002.
- 59.MÉNDEZ, M.C., ELIAS, F., RIET-CORREA, F., GIMENO, E.J., PORTIANSKY, E.L. Intoxicação experimental com frutos de *Melia azedarach* (Meliaceae) em suínos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 26, p.26-30, 2006.
- 60.MEYER, B.N., FERRIGNI, N.R., PUTNAM, J.E., JACOBSEN, L.B., MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, Stuttgart, v.45, p.35-34, 1982.
- 61.MIKOLAJCZAK, K.L., REED, D.K. Extratactives of seeds of the meliaceae: effects on *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith), *Acalymma vittatum* (F.), and *Artemia salina* Leach. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.13, n.1, 1987.
- 62.MORGAN, E. D.; THORNTON, M. D. Azadirachtin in the fruit of *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, New York, v. 12, p. 391-392, 1973.
- 63.MORTON, D.M. Importance of species selection in drug toxicity testing. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.102-103, p.545-550, 1998.
- 64.MUTTI, O. Toxicología vegetal. In: **Intoxicaciones más frecuentes en pediatria**. Buenos Aires: Macchi, 1992.
- 65.MWANGI, R.W.; REMBOLD, H. Growth inhibiting and larvicidal effects of *Melia volkensii* extracts on *Aedes aegypti* larvae. **Entomologia Experimentalis Applicata**, Boston, v. 46, p.103–108.1988.
- 66.NIERO, R. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos.IN: BRESOLIN, I. M; FILHO, V. C (org). **Ciências Farmacêuticas: Contribuições ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003. 239 p.
- 67.NIEZEN, J.H.; CHARLESTON, W.A.G.; HODGSON, J.; MACKAY, A.D.; LEATHWICK, D. M. Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: approaches, experiences and prospects. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v.26, p.983-992, 1996.
- 68.OECD- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline 423: **Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Paris: OECD,2001.
- 69.OECD- ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 420. **Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure**. Paris:OECD, 2001.

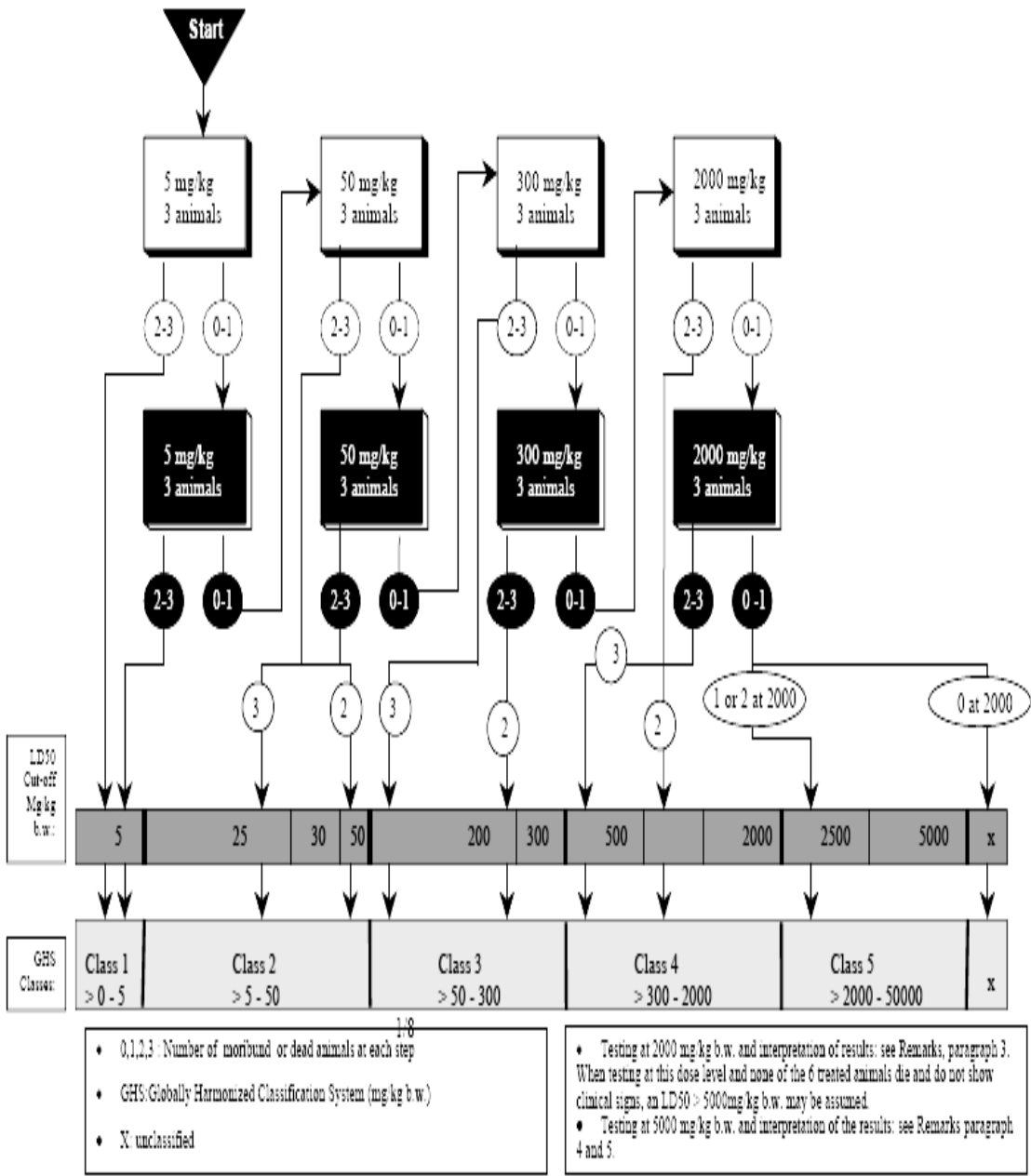
70. ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). OECD Guideline for the testing of chemicals, Guideline 425. **Acute oral toxicity - Up-and-down procedure**. Paris: OECD, 2000..
71. OECD- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline 404: **Acute dermal irritation/corrosion** Paris: OECD, 2002.
72. OECD- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline 405: **Acute eye irritation/corrosion**. Paris: OECD, 2002
73. OELRICHS P. B.; HILL, M. W.; VALLELY, P. J.; MACLEOD J. K.; MOLINSKY, T. F. Toxicity tetranortriterpenes of the fruit of *Melia azedarach*. **Phytochemistry**, New York, v. 22, p.531- 534, 1983.
74. OELRICHS, P. B.; HILL M. W.; VALLELY, P. J.; MACLEOD, J. K.; MOLINSKI T. F. The chemistry and pathology of meliatoxins A and B constituents from the fruit of *Melia azedarach* L. var. *australasica*. In: SEAWRIGHT, A.A., HEGARTY, M.P., JAMES, L.F. **Plant Toxicology**. Yeerongpilly: Queensland Poisonous Committee, Yeerongpilly, p.387-394, 1985.
75. PAUMGARTTEN, F. J.R.; PRESGRAVE, O. A. F.; MENEZES, M. A. C.; FINGOLA, F. F.; FREITAS, J. C. B. R.; CARVALHO, R. R. & CUNHA, F. Q. Comparison of Five Methods for the determination of Lethal Dose in Acute Toxicity Studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v.22, p.987-991, 1989.
76. PILLAI, N.R., SANTHAKUMARI, C. Toxicity study of nimbidin, a potential antiulcer drug. **Journal of Medicinal Plant Research**, Umudike, v.50, p.146–148, 1984.
77. PINTO, T.J.A ; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. Ensaios toxicológicos e de inocuidade. In: **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu; 2000. cap. 9, p. 275-309.
78. POTENZA, M. R., GOLD, S.J. LERNER, M.R., NESTLER, E.J. Efeito acaricida de alguns extratos vegetais sobre *Tetranychus urticae* (Koch, 1836) (ACARI: TETRANYCHIDAE) em laboratório. **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.66, n.1, p.31-37, jan./jun., 1999.
79. RAIZADA, R.B., SRIVASTAVA, M.K., KAUSHAL, R.A., SINGH, R.P. Azadirachtin, neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.39, p.477–483, 2001.
80. RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Amsterdam, v.39, p.603-613, 2001.

81. ROEL, A.R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. **Interações: Revista Internacional de Desenvolvimento local**, Campo Grande, v. 1, n.1, p.43-50, 2001.
82. SAKUMA, M. Probit analysis of preference data. **Applied Entomology Zoology**, Tokyo, v 3, p. 339-347, 1998.
83. SALLES, L. A. & RECH, N. L. Efeito de extratos de nim (*Azadirachta indica*) e cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Anastrepha fraterculus* (WIED) (DIPTERA: TEPHRITIDAE). **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 5, n.3, p 225-227, 1999.
84. SCHENKEL, E.L., ZANNIN, M., MENTZ, L.A., BORDIGNON, S.A.L., IRGANG, B. **Plantas tóxicas**. 5.ed. Florianópolis: UFRGS, p.959-993, 1990.
85. SCHULTZ, A.R.H. **Introdução à botânica sistemática**. V. II, Porto Alegre: UFRGS , 4. ed., 1984. p.414.
86. SCHUTTERER, H., Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, Stanford, v.35, p.271–297, 1990.
87. SEFFRIN, R.C.A.S. **Bioatividade de Extratos Vegetais Sobre *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera, Chrysomelidae)**. 2006.83 f. Tese (Doutorado em Agronomia)- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
88. SILVA JÚNIOR, A. A. **Plantas Medicinais**. Florianópolis: EPAGRI, CD-ROM. 1997.
89. SIMÕES, C. M. O. et al. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 172 p.
90. SIMOES, C. M. O., SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira Farmacognosia**, São Paulo, v.12, n.1, p. 35-40, 2002.
91. SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2002. 1102 p.
92. SIMOES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P. MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre, editora UFRGS, 2004, 1096p.

93. SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**, Porto Alegre: editora UFRGS, 2007. 1104p.
94. SOUSA, L.A.D.; SOARES, S.F.; PIRES JUNIOR, H.B.; FERRI, P.H.; BORGES, L.M.F. Avaliação da eficácia de extratos oleosos de frutos verdes e maduros de cinamomo (*Melia azedarach*) sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, São Paulo, v.17, n.1, p.36-40, 2008.
95. SOUSA, L.A.D. **Concentrado emulsionável de *M. azedarach* (Meliaceae) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2008. 55f. Dissertação (Mestrado em Sanidade animal)- Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
96. SOUZA, A.P.; VENDRAMIM, J.D. Efeito de extratos aquosos de meliáceas sobre *Bemisia tabaci* biótipo B em tomateiro. **Bragantia**, Campinas, v.59, n.2, p.173-179, 2000.
97. SOUZA, A. P. & VENDRAMIM, J. D. **Atividade inseticida de extratos aquosos de meliáceas sobre a mosca branca *Bemisia tabaci* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae)**. Neotropical Entomology, Londrina, v. 30 p.133-137, 2001.
98. SOUZA, A.P. et al. Avaliação “in vitro” da eficácia de fitoterápicos em teleóginas de *Boophilus microplus*. In: Ciclo de Atualização em Medicina Veterinária., 2004, Lages. **Anais...** Lages: CAV/UEDESC, 2004. p.127.
99. TAKEYA, K.; QIAO, Z.; HIROBE, C.; ITOKAWA, H. Cytotoxic trichilin-type timonoids from *Melia azedarach*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v.4, n.8, p.1355-1359, 1996.
100. TALALAY, P., TALALAY, P. The importance of using scientific principles in the development of medicinal agents from plants. **Academic Medicine**, Washington, v.76, p.238-247, 2001.
101. TIMM, C., RIET-CORREA, F. Plantas tóxicas para suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.3, p.521-528, 1997.
102. TUROLLO, M.S.R, NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. São Paulo, v.42, n.2, 2006.
103. VALLADARES, G.R.; FERREYRA, D.; DEFAGO, M.T.; CARPINELLA, M.C.; PALACIOS, S. Effects of *Melia azedarach* on *Triatoma infestans*. **Fitoterapia**, Milano, v.70, p.421- 424, 1999.
104. VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, 2006.

105. VIEIRA, P. C. & FERNANDES, J. B. Plantas Inseticidas. In: SIMÕES, C. M. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS /UFSC, p.739-754, 1999.
106. VIEGAS-JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v.26, p.390-400, 2003.
107. VEIGA JUNIOR V.P, PINTO, A.C. Plantas Medicinais : Cura segura ? **Química Nova**, São Paulo, v.28, n.3, p. 519-528, 2005.
108. VENDRAMIM, J.D., CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas, In: **Base e Técnicas do Manejo de Insetos**. Santa Maria: Pallotti, p.113-118, 2000.
109. YAMASAKI, B.R.; RITLAND, T.G.; BARNBY, M.A.; KLOCKE, J.A. Isolation and purification of salannin from neem seeds and its quantification in neem and chinaberry seeds and leaves. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.447, p.17-283, 1988.
110. YUNES, R.A., PEDROSA, R.C., CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil. **Química nova**, São Paulo, v.24, n.1, p.147-152, 2001.
111. WANDSCHEER, C.B.; DUQUE, J.E.; SILVA, M.A.N.; FUKUYAMA, Y.; WOHLKE, J.L.; ADELMANN, J.; FONTANA, J.D. Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. **Toxicon**, Elmsford, v.44, p.829-835, 2004.
112. WHO- Word Health Organization. **Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals**. Parte 1 EHC 6, 1978.
113. WHO- Word Health Organization. **The Controlo of Schistosomiais.**, Technical Report Series, p.83-86, 1993.
114. WILHELMUS, K.R. The Draize eye test. **Survey of Ophthalmology**, Brookline, v.45, n. 6, p.493-515, 2001.
115. XAVIER, J. O controle de pragas agrícolas e a sustentabilidade ecológica. **Ciência e Ambiente**, Santa Maria, v.27, n.2, p.67-84, 2005.
116. ZENICK, H., CLEGG, E.D. Assessment of the male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: HAYES, A. W. **Principles and methods of toxicology**. 2. ed. New York: Raven Press, 1989. p.275.

ANEXO I – TESTE PRINCIPAL – CLASSE DE DOSE AGUDA



ANEXO 2 - CLASSIFICAÇÃO DAS REAÇÕES DE PELE

Formação de eritema e escaras

Sem eritema.....	0
Eritema leve	1
Eritema bem definido.....	2
Eritema moderado a grave.....	3
Eritema severo com escaras.....	4

Maximo possível: 4

Formação de edema

Sem edema.....	0
Edema leve(apenas perceptível).....	1
Edema bem definido (bordas menores de 1 mm).....	2
Edema moderado (bordas de 1 mm).....	3
Edema grave (bordas com mais de 1 mm e não restrito às regiões de aplicação).....	4

Máximo possível: 4

Exames histopatológicos podem ser realizados para esclarecer ambigüidades.

ANEXO 3 - CLASSIFICAÇÃO DAS REAÇÕES OCULARES

Córnea (opacidade – grau de densidade)

Sem ulceração nem opacidade.....	0
Zonas de opacidade dispersas ou difusas, detalhes da íris notadamente visíveis.....	1
Zona translúcida facilmente discernível, detalhes da íris notadamente visíveis	2
Zona nacaradas, detalhes da íris completamente invisível, dimensão da pupila apenas discernível.....	3
Córnea opaca, íris não discernível através da opacidade.....	4

Máximo possível: 4

Íris(Irite – resposta inflamatória generalizada)

Normal	0
Dobras mais profundas, congestão, tumefação, hiperemia pericorneana moderada ou conjuntivas injetadas. Não importa qual desses sintomas está ocorrendo, ou se há uma combinação deles: a íris continua a responder a luz (Uma reação lenta porém positiva).....	1
Ausência de reação a luz, hemorragia, desnutrição marcante do tecido (cada um desses sintomas ou conjunto deles).....	2

Máximo possível: 2

Conjuntiva (vermelhidão das conjuntivas palpebrais e do bulbo, da córnea e da íris)

Normal.....	0
Hiperemia de certos vasos sanguíneos (olhos injetados).....	1
Coloração púrpura difusa, vasos sanguíneos individuais dificilmente discerníveis.....	2
Coloração vermelha fartamente distribuída.....	3
Quemose (pálpebras e/ou membrana nictante sem tumefação ou afundadas).....	4

Máximo possível: 4

