

## Toxicidade de Neem, *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), em *Artemia* sp: comparação da preparação comercial e do óleo puro

### *Neem Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) toxicity in *Artemia* sp: comparison of a commercial preparation and the pure oil

Ana Helena Varella Bevilacqua\*  
Ivana Barbosa Suffredini\*\*  
Maria Martha Bernardi\*\*\*

#### Resumo

**Introdução** – *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) é conhecida popularmente por Neem (nim) ou margosa e é caracterizada por ser uma frondosa árvore, presente em regiões tropicais sendo, provavelmente, originada da Ásia. É empregada há tempos não só em medicina e cosmética como também na agricultura, sendo empregada como praguicida. A azadirachtina é a substância ativa presente no óleo responsável por seu efeito praguicida. O presente trabalho comparou os efeitos tóxicos de uma formulação comercial e do óleo puro de *Azadirachta indica* A. Juss. em *Artemia* sp. **Material e Métodos** – Foram utilizadas artêmias no estágio náuplio I ou II as quais foram submetidas a diferentes concentrações do óleo puro e do produto formulado, tendo sido computada a presença de morte após 24 e 48 horas da exposição. **Resultados** – A formulação comercial empregada apresentou-se significativamente ( $p < 0.05$ ) mais tóxica do que o óleo puro da planta. **Conclusão** – Desde que o produto formulado é aquele empregado na agricultura, existe um risco maior se comparado ao óleo puro, quando atinge animais que habitem um corpo de água.

Palavras-chave: *Azadirachta indica*; *Artemia*; Testes de toxicidade

#### Abstract

**Introduction** – *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae), is popularly known as Neem or margosa. It is characterized by a leafy tree, present in tropical areas, probably originated from Asia. It is popularly used not only in medicine and cosmetic, but also in the agriculture, as a pesticide. The azadirachtin is the active substance of the oil and is the responsible for its pesticide effect. The current study compared the toxic effects of a commercial formulation made with the Neem oil and the pure Neem oil against *Artemia* sp. **Material and Methods** – The artemias employed here were in the nauplii I or II stage. These animals were submitted to different concentrations of the pure oil or of the formulated product. Death was assessed at 24 and 48 hours after the exposure. **Results** – Results showed that the commercial formulation was significantly ( $p < 0.05$ ) more toxic when compared to the pure oil. **Conclusion** – Since the formulated product is employed as agricultural pesticide, it would be represent a great risk when animals from aquatic environment were attained than the pure oil of the plant.

Key words: *Azadirachta indica*; *Artemia*; Toxicity tests

#### Introdução

*Azadirachta indica* A. Juss. pertence à família das Meliáceas, é conhecida popularmente por Neem (nim) ou margosa e é caracterizada por ser uma frondosa árvore, presente em regiões tropicais, provavelmente originada da Ásia. Muito conhecida e cultivada na Índia devido à suas propriedades medicinais, é utilizada há mais de 4.000 anos<sup>5</sup>. O Neem é cultivado para uso ornamental, na proteção de ambientes contra exposição solar intensa e possui também interesse econômico devido à comprovada resistência contra organismos xilófagos<sup>3</sup>.

Suas propriedades há muito tempo são utilizadas não

só em medicina e cosmética, mas também na agricultura, neste último caso como praguicida<sup>15</sup>. Apresenta efeito em mais de 200 espécies de organismos, incluindo ácaros, carrapatos, aranhas, nematóides, fungos, bactérias e mesmo alguns fitovírus<sup>14-15</sup>. A ação observada contra insetos esta relacionada à inibição da alimentação, regulação de crescimento e esterilização<sup>12</sup>. Os efeitos observados, provavelmente são resultados da presença de várias substâncias, tais como azadirachtina, nimbina, salannina, nimbidina, kaempferol, thionemone, quercetina e outras. A semente de Neem possui aproximadamente 40% de óleo de azadirachtina, que é o princípio ativo em maior

\* Bióloga. Mestre em Ciências Biológicas. E-mail: anahelena\_bio@yahoo.com.br

\*\* Farmacêutica. PhD, Professora Titular da Universidade Paulista (UNIP). E-mail: extractlab@unip.br

\*\*\* Bióloga. PhD, Professora Titular em Farmacologia e Toxicologia da UNIP. E-mail: bernarde@usp.br

concentração<sup>1</sup>.

Diversos inseticidas foram produzidos a partir do extrato da semente da árvore de Neem. Dois exemplos destes bioinseticidas são o Margosan-O® e o Daal-Neem® que possuem azadirachtina como princípio ativo sendo utilizado nos Estados Unidos e em países tropicais<sup>13</sup>. Scott e Kaushil<sup>13</sup> (2000) demonstraram que devido ao amplo espectro no controle de insetos, a utilização deste inseticida é favorável para a agricultura por não prejudicar o ambiente. Provavelmente este fato é decorrente da pequena meia vida residual dos componentes do Neem, pois azadirachtina permanece em seu estado puro por 24 horas, e na forma de Margosan-O apresenta meia vida de 6,85 dias.

A administração de extrato de Neem por via oral em ratos e coelhos produziu sintomas de toxicidade aguda. A CL<sub>50</sub> (dose letal que mata 50% dos organismos) do óleo de Neem foi de 14 ml/kg para ratos e 24 ml/kg para coelhos em 24 horas. Para ambas as espécies os órgãos alvos foram os pulmões e sistema nervoso central<sup>4</sup>. Em crianças o Neem provoca encefalopatia tóxica, cujos sintomas são vômito, taquiplnéia e convulsões<sup>6</sup>.

Um dos ramos da ecotoxicologia aborda a contaminação por produtos químicos naturais ou manufaturados resultado da ação antropogênica, que interfere na biologia dos organismos aquáticos, em vários níveis de organização, desde o subcelular, até comunidades e ecossistemas<sup>11</sup>. Estes efeitos podem ser letais a curto e longo prazo quando há toxicidade aguda, ou subletais apresentando alterações de comportamento, de crescimento, de reprodução, de alimentação, entre outras, observadas quando há toxicidade crônica. Os compostos tóxicos podem ser absorvidos e acumulados nos organismos e transferidos ao longo das cadeias alimentares, o que pode gerar interferências nos seres humanos em decorrência da contaminação de organismos com potencial econômico, do solo e dos recursos hídricos<sup>15</sup>.

Alguns tipos de invertebrados podem ser considerados representativos dos organismos que ocupam a base da cadeia trófica aquática e, também, apropriados para detectar os efeitos tóxicos de determinados agentes químicos. Em decorrência desses aspectos, tais organismos são fundamentais para avaliação dos efeitos adversos de substâncias e para o estabelecimento de concentrações aceitáveis destas para os ecossistemas onde vivem<sup>7</sup>.

A *Artemia* sp, conhecida também como camarão-de-salmora é um microcrustáceo, braquiópoda, pertencente ao filo Arthropoda. Esta espécie está distribuída ao longo dos cinco continentes<sup>16</sup>, sendo considerada cosmopolita e adaptada a vários ambientes, devido à relativa resistência a fatores de estresse ambiental como variações abruptas de salinidade, de temperatura e de oxigênio dissolvido<sup>10</sup>. Ainda, devido à ampla distribuição geográfica e resistência ambiental, *Artemia* sp é usada em inúmeros estudos sobre ecotoxicidade (TAS) e na avaliação de produtos como pesticidas, derivados petroquímicos e dispersantes, metais

pesados, derivados carcinogênicos e metabólitos de microrganismos, desde a década de 50<sup>9,16</sup>, tendo sido por estes motivos a escolha do invertebrado neste trabalho.

O presente estudo pretende avaliar os efeitos tóxicos do extrato de *Azadirachta indica* A. Juss. em *Artemia* sp. em um modelo utilizado para estudar a toxicidade, uma vez que azadirachtina é bastante utilizado na agricultura como pesticida, podendo contaminar e alterar a biodiversidade dos corpos d'água locais, trazendo consequências tóxicas ao homem.

## Material e Métodos

Foram realizados testes com extrato de folhas de *Azadirachta indica* A. preparado comercialmente e óleo puro de sementes de *A. indica*.

Cada 100 ml do extrato comercial (Dal neem®, Dalquim Com Ind. Ltda) contém 8,5 ml de extrato de folhas de neem indiano, 4,5 ml de emulsionante, 4,5 ml de álcool anidro e q.s.p. 100 ml de veículo oleoso (óleo vegetal). O óleo puro foi obtido das sementes de *A. indica* prensadas a frio.

Para o teste de toxicidade em *Artemia* sp, os ovos foram eclodidos em tanque com a lâmina d'água de aproximadamente 10 cm, utilizando água marinha sintética preparada com sal marinho (38g/l, RedSea®) dissolvido em água MilliQ, com a salinidade entre 80 a 100 ppm e temperatura entre 28°C (± 2°C). A alimentação dos organismos foi feita com a diluição de 100mg de fermento biológico fresco em 5 ml de água de manutenção<sup>9</sup>.

A metodologia adotada para os testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos baseia-se na proposta de Meyer *et al.*<sup>8</sup> (1982) com modificações e estão de acordo com a Norma da Cetesb<sup>2</sup>. Primeiramente foram realizados testes preliminares em uma ampla faixa de concentrações, a fim de se determinar a maior dose que não produziu efeitos tóxicos e a menor concentração que provoca 100% de efeito. A determinação do intervalo de concentração útil foi baseada naquela utilizada ambientalmente (10, 100 e 1.000µl).

O teste definitivo foi efetuado de acordo com as concentrações observadas nos testes preliminares. Para este, foi utilizada apenas uma amostragem feita em um único dia, evitando assim, alterações ambientais como temperatura, luminosidade, umidade relativa do ar e osmolaridade da água de manutenção.

Após 72h da eclosão dos ovos, foram separados náuplios em estágio I ou II de desenvolvimento, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, e colocados em tubos testes contendo 5ml de água de manutenção e diferentes doses do produto analisado.

Os testes com o preparado comercial de *A. indica*, foram feitas em doze diferentes concentrações: 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 1,3; 1,6; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 µl/ml além de um grupo controle que recebeu apenas solução salina.

Para o teste com o óleo puro, foram feitas diluições de doze diferentes concentrações: 1,6; 2,5; 5,0; 10,0;

12,5; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0; 40,0 e 60,0 µl/ml, além do grupo controle que também recebeu solução salina.

Cada concentração foi testada em 10 organismos em cinco réplicas, de modo que cada concentração fosse testada em 50 organismos. Os testes tiveram duração de 48 horas, e foram mantidos em temperatura ótima de manutenção ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

Após o final dos testes, foram realizadas análises físico-químicas como salinidade (variação entre 200 e 300 ppm); oxigênio (4mg/l); temperatura ( $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ); pH ( $8,0 \pm 0,2$ ).

Para o cálculo da toxicidade aguda, no qual determina-se a  $CL_{50}$ ; 24 ou 48 horas, ou seja, a concentração de agente tóxico que causa mortalidade de 50% dos organismos expostos no período de 24 ou 48 horas. Foi utilizada a análise probito (programa fornecido pelo National Cancer Institute, NIH, USA) para obtenção de  $CL_{50}$  e seus respectivos intervalos de confiança. Foram considerados mortos os organismos que não demonstraram reação após serem tocados e não apresentaram batimentos dos cílios.

## Discussão

Os presentes resultados indicam que as preparações empregadas neste trabalho apresentam toxicidade aguda diferente. Assim, o produto formulado é claramente mais tóxico que o óleo puro. Foi possível observar uma curva dose-resposta da toxicidade apresentada pelo óleo puro (Figura 1), cuja  $CL_{50}$  foi de 1,59 ml/ml. Porém não foi possível o cálculo da  $CL_{50}$  para os testes com o extrato comercial, pois a menor dose empregada às 48 horas produziu 100% de mortes dos animais.

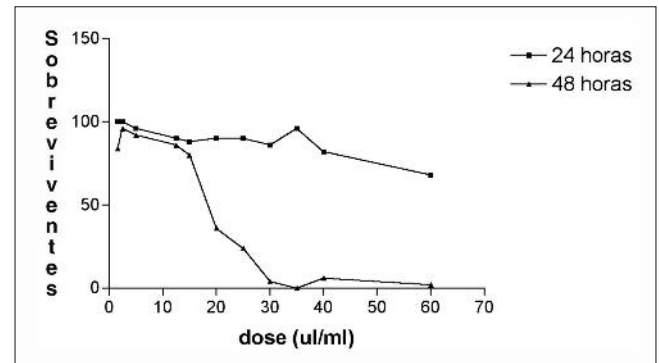


Figura 1. Curvas dose-resposta 24 e 48 horas da sobrevivência de *Artemia* sp ao óleo de Neem

Além disto, foram observadas diferenças no tempo de mortalidade entre as concentrações empregadas dos dois produtos. De fato, nota-se que às 24 horas após exposição as menores doses do óleo puro, poucos organismos morreram enquanto que na preparação comercial a mortalidade foi extremamente alta (Tabelas 1 e 2). Nota-se ainda que a menor dose do óleo que não produziu mortalidade às 24 horas foi 1,6 µl/ml enquanto que na mesma concentração da preparação comercial verificou-se 70% de mortalidade.

Portanto, é importante ressaltar que existem diferentes níveis de toxicidade entre a preparação comercial e do óleo puro. Este fato pode ser consequência da adição de componentes à formulação. Desde que preparação comercial é o produto empregado no meio ambiente pode-se sugerir que ele represente um alto risco para organismos aquáticos sensíveis.

Tabela 1. Número de náuplios de *Artemia* sp vivos nas doze diferentes concentrações de extrato comercial de *Azadirachta indica*. 1ª contagem realizada após 24h e 2ª contagem realizada após 48 horas da administração do preparado

Doses em µl/ml	Controle	0,1	0,2	0,4	0,8	1,0	1,3	1,6	2,5	5,0	10,0	20,0	40,0
1ª contagem													
Porcentagem média	100	20	10	10	0	0	20	30	10	10	10	0	0
2ª contagem													
Porcentagem média	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 2. Número de náuplios de *Artemia* sp vivos nas doze diferentes concentrações de óleo puro de *Azadirachta indica*. 1ª contagem realizada após 24h e 2ª contagem realizada após 48 horas da administração do óleo

Doses em µl/ml	Controle	1,6	2,5	5,0	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0	30,0	35,0	40,0	60,0
1ª contagem													
Porcentagem média	100	100	100	96	92	90	88	90	90	86	96	82	68
2ª contagem													
Porcentagem média	100	84	96	92	48	86	80	36	24	4	0	6	2

Os dados deste trabalho não permitem inferir sobre o mecanismo de ação tóxica do Neem, porém a impossibilidade de calcular uma curva dose resposta para a preparação comercial, sugere que a mesma parece agir em mecanismos essenciais para a sobrevivência dos organismos.

A avaliação toxicológica dos efeitos de substâncias em organismos marinhos e continentais é essencial para a manutenção da biodiversidade e da própria espécie humana<sup>15</sup>. Seu controle constitui uma abordagem de avaliação há muito adotada por países desenvolvidos.

Esses testes de toxicidade, realizados com organismos aquáticos representativos das comunidades biológicas, possibilitam a avaliação da toxicidade conjunta dos constituintes de um meio de natureza química complexa, tanto como suas interações.

## Conclusão

Os presentes resultados indicam diferenças na toxicidade entre o produto formulado e o puro de uma substância empregada como praguicida, reforçando a idéia de que testes ecotoxicológicos devem empregar os produtos comerciais e não só o princípio ativo puro para avaliação do risco/segurança de um produto a ser introduzido no meio ambiente.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, por meio do programa de bolsa (Pibic-Mackenzie) concedida a Ana Helena Varela Bevilacqua sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Martha Bernardi.

## Referências

1. Abdel-Shafy S, Zayed AA. *In vitro* acararicidal effect of plant extract of Neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). *Vet Parasitol.* 2002;106: 89-71.
2. Cetesb. Métodos para avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. São Paulo; 1997. v. 2.
3. Dimetry NZ, Amer SAA, Reda AS. Biological activity of two Neem seed kernel extracts against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch. *J Appl Entomol.* 1993;116:308-12.
4. Gandhi M, Lal R, Sankaranarayanan A, Banerjee CK, Sharma PL. Acute toxicity study of the oil from *Azadirachta indica* seed (Neem oil). *J Ethnopharmacol.* 1988;23:39-51.
5. Gurpreet K, Sarwar A M, Athar M. Nimbidin suppresses functions of macrophages and neutrophils: relevance to its antiinflammatory mechanisms. *Phytother Res.* 2004;18: 419-24.
6. Lai SM, Lim KW, Cheng HK. Margosa oil poisoning as a cause of toxic encephalopathy. *Singapore Med J.* 1990;31:463-5.
7. Marques Jr NA, Moraes RBC, Maurat MC. Poluição marinha. *In: Pereira RC, Soares-Gomes A. Biologia marinha.* Rio de Janeiro: Interciência; 2002. p.311-34.
8. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, MacLaughlin *et al.* Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Plant Med J.* 1982; 45:31-4.
9. Mendel AV, Toledo P. Laboratório de cultivo de *Artemia*. *In: Mendel AV, Toledo P. Acuicultura marina animal.* 2ª ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 1997.
10. Nardo EA, Costa AS, Lourenção AL. *Melia azadirach* extract as an antifeedant to *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Florida Entomol.* 1997;80:92-4.
11. Rand GM, Petrocelli SR. *Fundamentals of aquatic toxicology.* New York: Hemisphere Publishing; 1985.
12. Schmutterer H. Potential of Azadirachtin-containing pesticides for integrated pest control in developing and industrialized countries. *J Insect Physiol.* 1988;34:713-9.
13. Scott M, Kaushik NM. The toxicity of Neem insecticide to populations of culicidae and other aquatic invertebrates as assessed *in situ* microcosms. *Arch Environ Toxicol.* 2000; 39: 329-336.
14. Singh K, Singh A, Singh DK. Molluscicidal activity of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *J Ethnopharmacol.* 1996;52:35-40.
15. Souza ECPM. Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. *In: Nascimento, IA, Souza ECPM, Nipper M. Métodos de ecotoxicologia marinha.* São Paulo: Edit. Artes Gráficas; 2002. p.9-14.
16. Veiga LF, Vital NAA. Testes de toxicidade aguda com o microcústáceo *Artemia* sp. *In: Nascimento IA, Souza ECPM, Nipper M. Métodos de ecotoxicologia marinha.* São Paulo: Edit. Artes Gráficas; 2002. p.111-22.

Recebido em 14/05/2007

Aceito em 26/12/2007