



INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO
TOCANTINS
CAMPUS ARAGUATINS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MARIA FRANCISCA DA SILVA MELO

**ANÁLISE DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO ÓLEO DA SEMENTE DE
Azadirachta indica (NIM) POR MEIO DO SISTEMA TESTE *Allium cepa***

ARAGUATINS-TO
2017

MARIA FRANCISCA DA SILVA MELO

**ANÁLISE DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO ÓLEO DA SEMENTE DE
Azadirachta indica (NIM) POR MEIO DO SISTEMA TESTE *Allium cepa***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do Título de Conclusão do Curso Superior de Licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal do Tocantins, *Campus- Araguatins*.

Orientador: Prof. Esp. Luís Gustavo Torquato Feba
Coorientadora: Me. Andréa Ohanna Santos Carvalho

ARAGUATINS-TO

2017

MELO, Maria Francisca da Silva.
Análise do potencial citotóxico do óleo da semente
de *Azadirachta indica* (Nim) por meio do sistema teste
Allium cepa / Maria Francisca da Silva Melo – Araguatins.
2017. 43p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em
Ciências Biológicas) – Instituto Federal de Educação do
Tocantins, *Campus Araguatins*, 2017.

Orientador: Prof. Esp. Luís Gustavo Torquato Feba
Coorientadora: Me. Andréa Ohanna Santos Carvalho

1. Micronúcleos 2. anomalias 3. mitótico I. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO TOCANTINS
CAMPUS ARAGUATINS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "ANÁLISE DO POTENCIAL DO ÓLEO DE *Azadirachta indica* (NIM) POR
MEIO DO SISTEMA TESTE *Allium cepa*"

AUTOR: MARIA FRANCISCA DA SILVA MELO

ORIENTADOR: Prof. Esp. Luís Gustavo Torquato Feba

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia
do Tocantins, *Campus Araguatins*, como parte das
exigências para a conclusão do Curso de
Licenciatura em Ciências Biológicas.

Aprovado (a) em 14 / 12 / 2019

Prof. Esp. Luís Gustavo Torquato Feba
Instituto Federal do Tocantins – IFTO, *Campus Araguatins*

Prof. Me. Francisco Vieira
Instituto Federal do Tocantins – IFTO, *Campus Araguatins*

Profa. Graduada Carla Cristina da Silva
Instituto Federal do Tocantins – IFTO, *Campus Araguatins*

AGRADECIMENTOS

A iniciar a Deus, por sua infinita bondade por me conceder a graça de iniciar e concluir essa jornada e por todo o amparo por ele proposto em todas as esferas da minha vida.

À minha família, a qual constitui a razão maior de toda a minha perseverança empenhada na causa, em especial a minha mãe Luiza Alves da Silva, minha irmã Carmem Lúcia da Silva Melo e meu tio Domingo Alves da Silva, por todo o aporte e incentivo por eles oferecido.

Aos meus colegas de turma e de PIBID, em especial aqueles que se dispusera a me ajudar nessa reta final (compadre Pedro Everton Silva Torres, Marisa Oliveira da Silva e João Marcos Gomes Leite).

À Jakeline da Silva Saraiva e Jaira Alcântara dos Santos pelo belíssimo papel de colega, amigas, irmãs, mãe (Jakeline), conselheiras durante essa fase de lutas, pela parceria de vida.

Aos professores que contribuíram para a minha formação científica e pessoal, em especial a prof. Me. Kátia Paulino pelo seu acolhimento fraterno aos discentes do *campus* e por ser um exemplo pessoal e profissional. Aos que aceitaram o desafio de orientar-me na realização desse trabalho, prof. Me. Luiz Brito de Souza Filho, Dr^a. Rosângela Martins, Me. Saulo Antônio Gomes Filho, Me. Andréa Ohanna Santos Carvalho, Esp. Luiz Gustavo Torquato Feba e em especial a professora Lic. Carla Cristina da Silva por lutar junto comigo para o êxito do mesmo, pelas orientações, pela paciência e docilidade ao fazê-las, por ter se tornado um exemplo pessoal e profissional, por conceder uma mão amiga na hora em que as coisas pareciam desandar, enfim, por todo o apoio oferecido e empenho.

Aos professores constituintes da banca avaliadora, e em ressalva, fica a imensa gratidão pelos conselhos recebidos do professor Francisco Vieira, os quais foram determinantes em diversas atitudes por mim assumidas.

De forma geral ao IFTO – *Campus* Araguatins, a toda equipe de profissionais, do terceirizado à diretoria, pela assistência oferecida, e a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente, com ou sem real intenção de assim fazê-lo, para a minha permanência e conclusão dessa jornada.

Minha mais sincera e eterna gratidão!

“Faça o teu melhor, na condição que
você tem, enquanto você não tem
condições melhores, para fazer melhor
ainda!”

(Mario Sergio Cortella)

RESUMO

Diante de um cenário marcado pela ampla utilização e aplicação de compostos biológicos como fármaco, em cosméticos, no campo como herbicida, inseticida e no controle de zoonose, a abordagem sobre o potencial nocivo destes compostos se faz crucial para determinar uma forma mais segura de utilizá-los. O Nim (*Azadirachta indica*) tem se destacado em estudos voltados para essas aplicações e o óleo da semente recebe um maior enfoque nesse sentido. O presente trabalho objetivou analisar o potencial citotóxico do óleo da semente do nim mediante teste *Allium cepa* e avaliar o comportamento mitótico após exposição ao óleo por diferentes períodos. Os tratamentos se deram em 4 períodos diferentes, submetidos a óleo puro, e para cada tratamento um controle negativo (somente com água). Analisou-se 2500 células por bulbo, onde 3 bulbos determinavam um bloco, havendo 3 repetições por tratamento, e os tratamentos consistiram em 12, 24, 36 e 48 horas de exposição ao óleo puro da semente e 4 controles de mesmos períodos. Como resultado, obteve-se redução do índice mitótico para o tratamento 1 e aumento para os demais. Houve ainda a ocorrência de anomalias cromossômicas como formação de micronúcleos, anomalias no fuso e pontes cromossômicas, sendo que para as duas primeiras o tratamento 4 apresentou maior frequência, e a incidência de ponte cromossômica mostrou-se mais frequente para o tratamento 1. A partir desses dados, é possível aferir citotoxicidade ao óleo, por este interferir, comprometendo a divisão celular, ou seja, dificultando o crescimento ou desenvolvimento do *A. cepa*.

Palavras-chave: óleo de nim; anomalias genéticas; índice mitótico.

ABSTRACT

In view of a scenario marked by the wide use and application of biological compounds as a drug, in cosmetics, in the field as herbicide, insecticide and zoonosis control, the approach on the harmful potential of these compounds becomes crucial to determine a safer way to use them. Nim (*Azadirachta indica*) has excelled in studies aimed at these applications, and seed oil receives a greater focus in this regard. The present work aimed to analyze the potential cytotoxicity of the oil of the neem seed by means of *Allium cepa* test and to evaluate the mitotic behavior after exposure to the oil for different periods. The treatments took place in 4 different periods, being pure oil, and for each treatment a negative control (only with water). 2500 cells were analyzed per bulb, where 3 bulbs determined one block, with 3 replicates per treatment, and treatments consisted of 12, 24, 36 and 48 hours exposure to pure seed oil and 4 controls of the same periods. As a result, a reduction in the mitotic index for treatment 1 was obtained, and an increase for the others, there were still the occurrence of chromosomal abnormalities such as micronucleus, spindle anomalies and chromosomal bridges. the incidence of chromosome bridge was more frequent for treatment 1. From these data, it is possible to measure cytotoxicity to the oil, because this interferes, compromising the cell division, that is, making the growth or development of *A. cepa* difficult.

Keywords: Nim oil; genetic anomalies; mitotic rate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Complexo: Extrator Soxhlet e manta aquecedora.....	22
Figura 2 - Rotaevaporador	23
Figura 3 - Cebolas expostas em água para emissão das raízes.....	24
Figura 5 - Montagem do tratamento 1 e controle 1	25
Figura 4 - Recipiente com cola nas bordas (A), como cola e pote J10 no interior (B) e como cola e pote J10 no interior com bulbo	25
Figura 6 – interfase normal A e F, prófase normal I, metáfase B e H, anáfase G, telófase c e J, ponte cromossômica L, anomalia no fuso E e K, micronúcleos D;.....	29

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Índice mitótico (IM)	28
Gráfico 2 - Células com anomalias no fuso evidenciado pela desorganização dos cromossomos	29
Gráfico 3 - Formação de micronúcleos	30
Gráfico 4 - Quantitativo de pontes cromossômicas ...	Erro! Indicador não definido.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	Aspectos botânico do <i>Azadirachta indica</i>	13
2.2	Aspectos econômicos e aplicação do nim.....	14
2.3	Óleo natural do fruto do nim	15
2.3.1	Composição do óleo natural do fruto do nim	16
2.5	Citotoxicidade e o teste <i>Allium cepa</i>	18
2.6	Aspectos gerais do sistema teste <i>Allium cepa</i>.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Local do experimento	21
3.2	Obtenção dos materiais dos experimentos	21
3.3	Extração do óleo natural da semente do nim	21
3.4	Ensaio biológico.....	23
3.5	Análise das células mitóticas de <i>Allium cepa</i>.....	26
3.6	Avaliação citotóxica do óleo natural da semente do nim no meristema radicular da <i>Allium cepa</i>	27
3.7	Análise estatística	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
	REFERÊNCIAS:.....	34

1 INTRODUÇÃO

A família Meliaceae tem sido considerada, dentre as diversas espécies utilizadas na agricultura orgânica, um dos grupos mais promissores por apresentarem uma variedade significativa de moléculas biologicamente ativas capazes de influenciarem no desenvolvimento de outros organismos (RICKLI *et al.*, 2011).

Segundo Gonçalves-Gervásio (2003) e Moreira (2017), Cinamomo ou Santa-bárbara (*Melia azedarach* L.), *Trichilia pallida* e *Azadirachta indica*, conhecida como Nim, são as espécies mais estudadas desta família, na qual há 550 espécies distribuídas em 51 gêneros e tal interesse se deve às atividades químicas de seus compostos.

Planta tropical, o nim (*A. indica*) há séculos tem sido utilizado no Oriente como planta medicinal, atuando em diversos tratamentos como inflamações, infecções virais, hipertensão e febre, além de ser uma planta que oferece sombra, têm aplicação na formulação de repelentes, material para construção, combustível, lubrificantes, adubos e, nas últimas décadas, na agricultura como praguicidas (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005).

Acarretado pela preocupação com o meio ambiente, recursos naturais, saúde humana e animal, e pelas barreiras fitossanitárias impostas pelo mercado, segundo Medice, Bettiol e Altéa (2013), estudos vêm sendo realizados, em busca de descobrir e desenvolver alternativas de controle e manejo de doenças e fitopatologias, assim como biofungicidas, biobactericidas e bioinseticidas a partir de extratos, decóctos vegetais e óleos essenciais. Estudos acerca da aplicação do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) como inseticida no controle da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) (SANTOS *et al.*, 2010), extrato de *Jacaranda decurrens* subsp *Symnetrifoliolata* (Bignoniaceae) sobre a Traça-das-crucíferas (*Plutella xylostella*) (SANTOS *et al.*, 2016), óleo essencial de tomilho branco em bactérias que acometem a produção aquícola (KOTZENT *et al.*, 2016) entre outras tem sido realizadas por instituições de ensino e pesquisa.

Nesta nova categoria de produtos ecologicamente corretos com potencial de aplicação na agricultura, o óleo de nim tem se destacado, demonstrando ser isento de propriedades nocivas aos animais de sangue

quente, peixes e a diferentes espécies de minhocas e demais organismos do solo (GARCIA, 2000).

Ainda segundo Garcia (2000), este bioproduto apresenta em insetos ação dermal (penetra através da cutícula, dificulta síntese de quitina e manutenção da hidratação corpórea), efeito repelente, dificilmente estes organismos desenvolverão resistência as suas propriedades e tais características são acentuadamente relacionadas à azadiractina, seu constituinte predominante.

Além das propriedades acima citadas, tem-se comprovado que extratos de suas diversas estruturas apresentam propriedades carrapaticidas em testes para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (SRIVASTAVA *et al.*, 2008; SANTOS, OLIVEIRA, ALBUQUERQUE, 2012), controla *Otodectes cynotis* em cães (FERNANDES *et al.*, 2010). Já o óleo comercial atua no controle de verminoses gastrintestinais de caprinos, diminuiu a contagem de OPG (ovos por grama de fezes) (NOGUEIRA *et al.*, 2005), apresentou eficiência no controle de *Brevicoryne brassicae* e *Myzus persicae* (CARVALHO *et al.*, 2008) além de inibir o crescimento de *Colletotrichum acutatum* (DIAS-ARIEIRA *et al.*, 2010) entre outros.

Tais propriedades resultam da toxicidade de compostos presentes na planta do nim e são atribuídas principalmente à azadiractina, um composto biodegradável sensível à umidade, exposição solar e alterações de pH, e por isso de rápida degradação (GUERRINI; KRITICOS, 1998; DIAS-ARIEIRA *et al.*, 2010).

Sabe-se que os extratos foliares e do fruto do nim apresentam citotoxicidade elevada, como afirma Awasthy, Chaurasia e Sinha (1999). Este ainda propõe que tal citotoxicidade deve-se a um ou vários dos constituintes dos extratos. Em ensaios em ratos, comprovaram influência nas atividades do DNA, desencadeando ruptura da cadeia dos cromossomos ou ainda perturbações do fuso, acarretando efeitos genotóxicos tardios.

Porém, quando se trata da citotoxicidade do óleo da semente não há relatos de testes realizados, havendo assim uma escassez de material bibliográfico quanto as suas propriedades. Contudo, é imprescindível avaliar seu potencial citotóxico, a fim de mensurar as possibilidades deste metabólito oferecer algum risco à saúde do usuário, dos animais ou até a própria cultura

na qual se deseja aplicar, permitindo ao produtor ou a pessoa a qual for manipular ou ingerir este óleo optar por uma forma segura e racional, a fim de minimizar os efeitos nocivos

Diante deste contexto, o objetivo deste trabalho está calcado em avaliar o potencial citotóxico do óleo natural da semente da *A. indica* mediante sistema teste *Allium cepa* por meio da análise do desenvolvimento do ciclo de divisão mitótica das células das raízes de *A. cepa* após tratamento com este óleo e comparar o comportamento dos cromossomos em resposta aos diferentes períodos de exposição ao óleo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos botânico do *Azadirachta indica*

A *A. indica* denominada popularmente como nim, de origem indiana, consiste em uma árvore milenar, a qual tem tido diversas aplicações há séculos em inúmeros fins. Pertence a ordem Rutales, subordem Rutinea, família Meliaceae, subfamília Melioideae e tribo: Melieae segundo a classificação de Pio-Corrêa (1984).

Embora seja uma planta de clima tropical, também adapta-se bem a regiões subtropicais, sendo encontrada comumente em áreas tropicais e subtropicais da África, Austrália e Américas, inclusive no Brasil (AZEVEDO et al., 2010)

Segundo Schumutterer (1990), é uma planta perene ou decídua, resistente e de rápido crescimento, podendo atingir até 25 metros de altura mediante fatores como clima, umidade e nutrição favoráveis. Apresenta frutos oviformes com 1,5 a 2,0cm de comprimento. Após a maturação a polpa manifesta sabor adocicado e cor amarelada e a semente presente em uma única unidade por fruto, possui um tegumento branco o qual contém um óleo verde amarelado.

Quanto às folhas, Neves (2004), afirma que são compostas imparipenadas, não apresentam estípulas e são de cor verde-escuras. As flores configuram-se hermafroditas, apresenta característica aromática, cor branca, inflorescência densa, seus estames formam um tubo e referente à frutificação, a depender das condições ambientais, estas árvores produzem frutos até duas vezes por ano, de 30 a 50 kg por espécime.

Seu Tronco é semirreto, curto e duro, de diâmetro entre 30e 80 cm e apresenta coloração marrom avermelhada. A copa varia em diâmetro, podendo ter de 8 a 12m em média, atingindo até 15m em espécimes isoladas. São atrativas devido ao grande número de folhas constantemente verdes. Sua sustentação se dá devido às raízes penetrarem no solo a profundidades consideráveis (BRASIL, 2013).

2.2 Aspectos econômicos e aplicação do nim

O nim apresenta ampla aplicação, justificando o grande número de pesquisas que tem sido realizada a cerca desta árvore. Neves, Oliveira e Nogueira (2003) mencionam que na Índia ela é utilizada há mais de dois milênios, nos mais diversos fins, os quais vão desde a fabricação de cosméticos, reflorestamento, como madeira de lei, adubo, paisagismo, controle de nematóides, bactérias, vírus, insetos pragas (minadora, mosca-branca, carrapato, brasileirinho, lagartas e pragas de grãos armazenados) e alguns fungos, assim como na medicina humana e animal.

No Brasil, assim como em vários outros países, subprodutos dessa árvore têm sido utilizados em diversos estudos, a fim de desenvolver produtos alternativos aos agroquímicos (NEVES; OLIVEIRA; NOGUEIRA, 2003). Segundo Roel (2001), a ação resultante da associação de vários princípios ativos dificulta o desenvolvimento de resistência pelas pragas a serem controladas, tornando-a eficiente por um maior período de tempo. A inexistência de resíduos deixados nos alimentos por estas substâncias, além de serem oriundos de fontes renováveis e de fácil degradação no meio ambiente, torna a utilização de subprodutos de plantas com atividades praguicidas bem mais vantajosa comparada ao uso dos sintéticos.

Na medicina, Martinez (2002) e Paiva e Neves (2009) argumentam que esta pode ser utilizado tanto como vermífugo, tônico, anti-séptico, no tratamento de problemas dermatológicos, diabetes, malária, além de combater a sarna, pulga, diarreias, distúrbios urinários e outras doenças.

Estudos ainda comprovam a presença de potencial para aplicação desta planta na saúde animal (pecuária), ensaios em caprinos apontam efeito positivo do extrato aquoso de folhas secas no controle da eclosão das larvas de nematódeos gastrintestinais (CHAGAS; VIEIRA, 2007), no controle de emergência das moscas das pupas de moscas *Lucilia cuprina*, *Chrysomya megacephala*, *Cochliomyia hominivorax* e *Musca domestica* reduzindo significativamente (DELEITO; BORJA, 2008), propriedade acaricida sobre teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (BUZATTI et al., 2013), eficiência relativa de 40% na eliminação de *Boophilus microplus* (XAVIER et al.,

2010), reduz significativamente o número de ovos nematóides em cabras (ACOSTA, 2012), entre outros.

A aplicação desta planta e seus subprodutos no Brasil e no mundo é promissor. Com isso a sua importância econômica apresenta-se elevado e em ascensão, e estudar a atuação de seus princípios ativos sobre outros organismos pode contribuir com a possibilidade de se determinar outras formas de aplicação, assim como forma de extração mais racional e segura.

2.3 Óleo natural do fruto do nim

Devido suas propriedades medicinais e praguicidas vem sendo fonte de intensos estudos. Tais propriedades advêm do grande número de metabólitos secundários que apresentam atividades biológicas importantes, onde a Azadiractina se destaca quanto a sua importância ecológica (FORIM, 2006). De acordo com Schumutterer (1990), ação detergente, reguladora de crescimento, da alimentação, atividade ovopositora, da fecundidade e redução da aptidão física do inseto desencadeada pelo nim são atribuídas a Azadiractina.

O óleo natural da semente do nim, tanto quanto o extrato foliar tem tido diversas aplicações principalmente em meio de produção, seja animal ou vegetal. Bioensaios mostraram que em determinadas concentrações o óleo apresentou eficácia no controle da mancha angular do feijoeiro *Phaeoisariopsis griseola* (CARNEIRO; PIGNONI; GOMES, 2008), repelência de até 89,4% sobre de *Zabrotes subfasciatus* adultos em sementes de feijoeiro (OLIVEIRA; VENDRAMIM, 1999), significância no controle da mosca minadora em meloeiro promovendo da mortalidade larval e pupal (SILVA *et al.*, 2015), e efetivo na redução do crescimento, esporulação e viabilidade de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* e *Paecilomyces farinosus* (MARQUES; MONTEIRO; PEREIRA, 2004) entre outros.

Na pecuária, testes investigativos inferem ao óleo do nim também uma grande importância devido à atuação no controle de endo e ectoparasitos, pois aplicação oral em caprinos pode reduzir o número de ovos por grama de fezes (OPG) de nematódeos (PAIVA; NEVES, 2009), do carrapato bovino - *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, ocasionando a mortalidade dos mesmos,

dias após o tratamento além de interferir na reprodução (BROGLIO-MICHELETTI *et al.*, 2010), do *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae) popularmente conhecido como cascudinho do aviário, o qual acomete aves comprometendo a conversão alimentar e o ganho de peso das mesmas (MARCOMINI *et al.*, 2009) além de outros diversos potenciais descritos na literatura.

Na medicina, há centenas de anos o nim tem tido aplicação na etnomedicina indiana no tratamento de problemas intestinais, sífilis crônica, hanseníase, reumatismo, úlceras, desordens respiratórias, constipação, infecções de pele e escabiose. Para tais tratamentos utilizam-se desde as folhas, frutos, sementes até as casca da árvore, sendo a hanseníase e vermes intestinais tratados especificamente com o óleo da semente (BISWAS *et al.*, 2002).

O óleo e seus constituintes inibem o desenvolvimento de fungos em homens e animais, por exemplo, o gedunine apresenta ação antimalárica (NEVES; OLIVEIRA; NOGUEIRA, 2003). Há ainda a utilização empírica desta planta na medicina popular no tratamento de outros diversos problemas.

Os ésteres presentes na oleaginosa também são utilizados na fabricação de cosméticos, tônicos capilares, sabonetes, óleos para cabelos, pasta dental, filtro solar (NEVES; OLIVEIRA; NOGUEIRA, 2003).

Contudo, semelhante ao extrato foliar, o óleo da semente também apresenta toxicidade, a qual pode ocasionar problemas se utilizado de forma indiscriminada. Paiva e Neves (2009), em testes em caprinos obtiveram dados que aferem que dosagens superiores a 1.500 mg/mL por peso vivo ocasionam intoxicações no animal. Brito (2013) observou alteração no quadro de saúde e ocorrência de óbito resultante da administração do óleo de nim por via oral em concentrações elevadas em ovinos. Outros eventos ocasionados pela toxicidade deste composto são descritas na literatura, o que ressalta a necessidade de maiores restrições e cuidados acerca de seu uso.

2.3.1 Composição do óleo natural do fruto do nim

Em média se obtêm 467 mg de óleo por semente e, por grama de semente, 3,6 mg de azadiractina. Seis substâncias já foram isoladas, dentre

elas a neemola ($C_{15}H_{30}O_3S$); margosina ($C_{28}H_{48}O_{10}$), um glicosídeo; ácido palmítico; ácido oléico, ácido tetradecenóico; e um ácido denominado D. Dentre os princípios ativos, três já foram também isolados: nimbim (0,1%), nimbinim (0,01%) e nimbidim (1,1%) (NEVES, OLIVEIRA E NOGUEIRA, 2003).

Brito (2013) descreve o óleo como amarelo acastanhado e sabor amargo, além de apresentar natureza hidrofóbica, cita Kumar *et al.* (2010), o qual atribui à miliacina os princípios amargos, e ao ácido tignico (5-metil-2-ácido butânico) o odor característico do mesmo.

Suryawanshi (2011) coloca que ácidos graxos, aminoácidos essenciais, vitamina E, triglicerídios e compostos triterpenóides constituem o óleo de nim e que, além da azadiractina, estão presentes azadiradiona, salanol nimbinene, nimbin, vilasinin, salanin, vepinin, nimbidin e princípios amargos, taninos, flavonoides e derivados sesquiterpênicos. E dentre os ácidos graxos, o ácido oleico (50-60%), palmítico (13-15%), esteárico (14-19%), linoleico (8-16%) e araquidônico (1-3%) são os principais e que os Ácidos graxos insaturados constituem-se mais abundantes do que saturados.

2.4 A divisão celular e a citotoxicidade

O processo de divisão celular está diretamente envolvido no desenvolvimento dos organismos vivos, contudo, anormalidades nesse processo acarretam o surgimento de várias doenças, principalmente no desenvolvimento de tumores. O ciclo celular inicia-se com o aumento do tamanho da célula, para que haja espaço para a duplicação do material genético (intérfase). Após duplicado, os cromossomos começam a separar-se para os pólos da célula (prófase). A presença de algumas moléculas pode fazer com que os cromossomos duplicados não consigam separar-se corretamente durante a prófase, gerando anomalias denominadas pontes cromossômicas. Em outros casos, a reorganização dos cromossomos nos núcleos pode ser comprometida, gerando anomalias de fuso (quando os cromossomos não conseguem anovelar-se de maneira correta) ou micronúcleos (quando os cromossomos organizam-se em mais de um aglomerado). Estas anomalias podem desencadear a apoptose das células, formando tumores e outros

problemas de formação para a célula. Nestes casos, onde o desenvolvimento normal da célula é comprometido, podemos considerar a substância á qual a célula foi submetida como citotóxica (GRIPPA *et al.*, 2010).

2.5 Citotoxicidade e o teste *Allium cepa*

Os seres vivos apresentam um material genético definido por uma ordem específica de nucleotídeos constituindo a molécula de DNA. No entanto, normalmente esta sequência se encontra exposta à agentes variados, capazes de promover alterações na sua estrutura ou composição química, originando mutação ou induzindo a morte celular (ZAHA, FERREIRA, PASSAGLLA 2003). Diante do exposto, diversos testes foram desenvolvidos para avaliar capacidade citotóxica e mutagênica de diversas substâncias.

No que se refere à toxicidade desses compostos, Araújo *et al.* (2008) propõe que configura-se citotóxico um composto capaz de afetar suas funções celulares, ocasionando a morte da mesma, e genotóxicas as que apresentam potencial de alterações cromossômicas e genéticas da célula (KASPER *et al.*, 2015).

Bezerra, Dinelly, Oliveira (2016) ressaltam a importância na realização de pesquisas que objetivem avaliar ou descobrir as possíveis ameaças atreladas ao uso de plantas medicinais em seres humanos e animais.

Com o bioensaio usando *Allium cepa* pode ser analisados o potencial tóxico e citotóxico de substâncias ou compostos oriundos de plantas como extratos, óleos, decóctos e essências vegetais. Quando são observadas alterações, o composto testado é considerado alopático ou fitotóxico (MELO 2015). É comum que espécies vegetais alelopáticas tenham potencial citotóxico, alterando, por exemplo, o índice mitótico das plantas susceptíveis (FERREIRA, 2014).

Conforme Souza *et al.* (2005), avalia-se a citotoxicidade de substâncias sobre outros organismos mediante ocorrência de alterações no processo de divisão celular, redução do índice mitótico e proliferação, perda de cromossomos inteiros, quebras cromatídicas, incidência de mutações cromossômicas ou a formação de micronúcleos.

2.6 Aspectos gerais do sistema teste *Allium cepa*

Diversos compostos químicos produzidos em algumas plantas apresentam potencial para promover alterações no desenvolvimento de outros seres vivos, sendo estas outras plantas ou até mesmo outros organismos (IGANCI *et al.*, 2006). Diversos ensaios e bioensaios laboratoriais foram desenvolvidos a fim de analisar essas interações e seus resultados.

A manipulação de plantas e a utilização destes organismos em bioensaios é consideravelmente menos complexo quando comparado à utilização de animais para tais fins. Além do mais, as plantas apresentam uma sensibilidade mais elevada à interação com fatores químicos e físicos do meio externo, o que justifica a sua frequente utilização para monitoramento de poluentes ambientais (PEDRO, 2008). Assim, testes com plantas tem tido cada vez mais espaço nas análises laboratoriais.

Levan (1938) foi o primeiro a introduzir o teste com *Allium cepa*, e considerou esta planta adequada por apresentar número diplóide de cromossomos, ou número total de cromossomos das células somáticas normais reduzido ($2n=16$) e de fácil análise da morfologia cromossômica e do comportamento mitótico. Segundo Melo (2015) e diversos outros autores este bioensaio é considerado efetivo devido a sua alta simplicidade, sensibilidade e rapidez, além de ser um teste barato e por isso viável. Esta espécie apresenta ainda um número considerável de células em divisão, raiz com rápido crescimento e disponibilidade para obtenção durante todo o ano.

O sistema teste *A. cepa* obteve aceitação e passou então a ser um teste padrão para análises toxicológicas de ampla aplicação. O método baseado em parâmetros como aberrações cromossômicas assim como comportamento deste durante o ciclo de divisão celular mitótico é validado segundo Cabrera e Rodriguez (1999) como eficiente para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de diversas substâncias pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, WHO) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP).

A validade deste teste justifica suas inúmeras utilizações, sendo este usado como bioensaio para testar diversas substâncias tais como: chás, sucos,

medicamentos, aditivos alimentares, agrotóxicos, águas de inúmeras fontes, esgotos e dejetos domésticos e industriais (COSTA *et al.*, 2015).

Teixeira *et al.*(2003) obtiveram resultados semelhantes após realizaram testes de citotoxicidade em fibroblastos de mamíferos e em células meristemáticas de *A. cepa*. Estes achados corroboram a eficiência do bioensaio com *A. cepa* quando comparado com aqueles realizados com células animais e a correspondência entre os mecanismos de ação tóxica atuantes em células animais e vegetais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

A extração do óleo foi realizada no Laboratório de Química e Bioquímica e os testes de citotoxicidade no laboratório de Citogenética, ambos do Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia do Tocantins – *campus* Araguatins.

3.2 Obtenção dos materiais dos experimentos

Os frutos de nim foram coletados na cidade de Araguatins – TO, durante o mês de março do presente ano, sendo colhidos somente os recém caídos com características indicativas da maturação, pois, estudos apontam que é neste estágio que o fruto apresenta maior teor de óleo em suas amêndoas, afirma Cremonez *et al*, 2017 a partir de estudos com pinhão manso (*Jatropha curcas L.*).

Foram descartados os frutos que apresentaram coloração verde consistente e poupa rígida, pois tais características aferem estágio verde ao fruto. Frutos com aspectos envelhecidos ou com fungos eram refugados na coleta.

As cebolas foram adquiridas em pontos comerciais do município, sendo escolhidas pela semelhança de tamanho e forma entre si, assim com aspectos visuais de sanidade, como consistência dos catafilos, folhas ou escama, integridade do prato, local de onde emergem as raízes, assim como ausência de hifas (fungos).

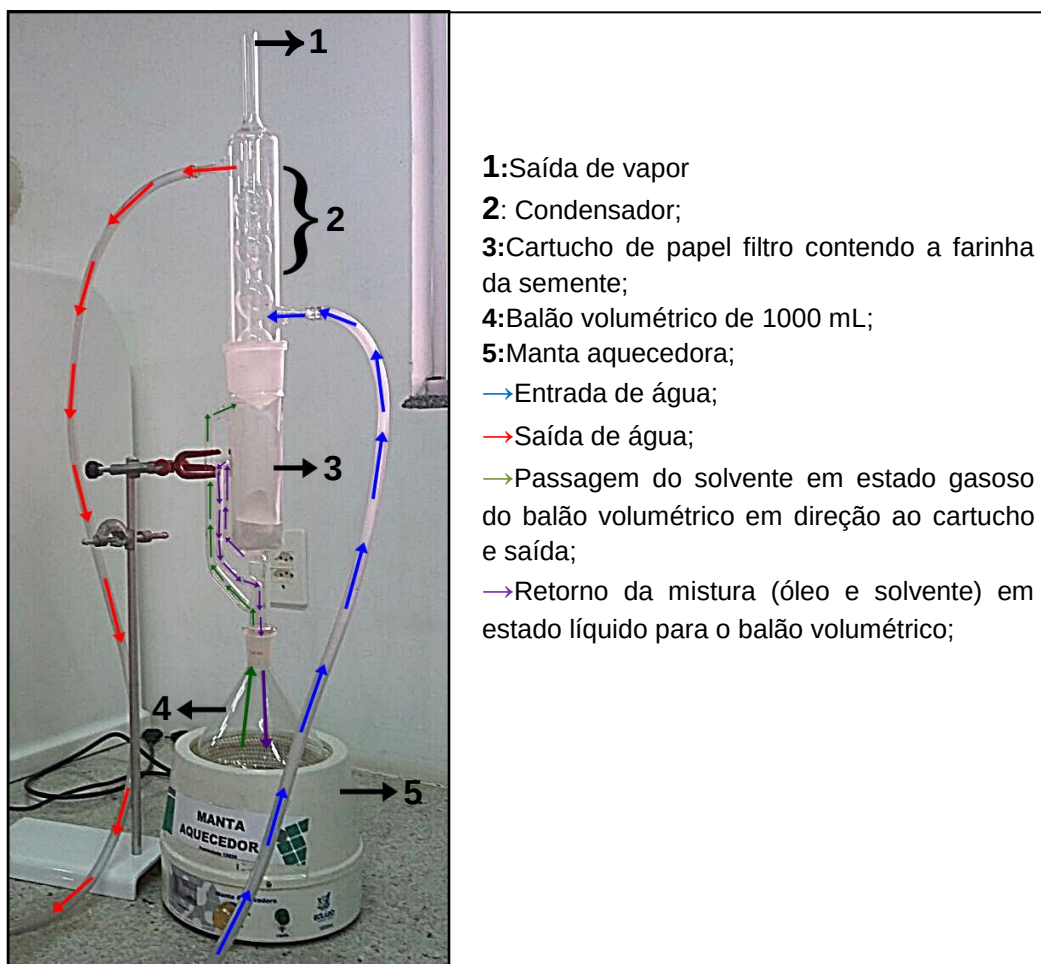
3.3 Extração do óleo natural da semente do nim

A extração do óleo se deu de acordo com o método proposto por Paes *et al.* (2015) com modificações, em que, após a colheita, as sementes foram submetidas a um processo de despulpamento mediante água corrente e escarificação manual com peneira de malha 2x3 mm, e então pré-secas em temperatura ambiente por 24 horas. Em seguida foram armazenadas em geladeira em recipiente âmbar até alcançar quantidades suficientes para

extração do óleo. Alcançando tal quantidade, foram devidamente secas em estufa com circulação e renovação de ar a 65 °C, durante 72 horas. Posteriormente, em um liquidificador tradicional, as sementes secas foram trituradas até a obtenção de uma farinha.

Baseado na proposta de Benício, Neto, Sousa (2010) com modificações, o óleo foi extraído a partir da farinha por meio de extrator Soxhlet apresentado na Figura 1, utilizando como solvente o *n*-hexano, onde em um balão volumétrico com capacidade de 1000 mL adicionou-se 80 g da farinha e 250 mL do solvente extrator *n*-hexano, aquecido com o auxílio da manta aquecedora a uma faixa de temperatura entre 160 e 164°C por um período médio de 1 hora e 40 minutos até a obtenção do extrato.

Figura 1 - Complexo: Extrator Soxhlet e manta aquecedora



Fonte: Melo, 2017.

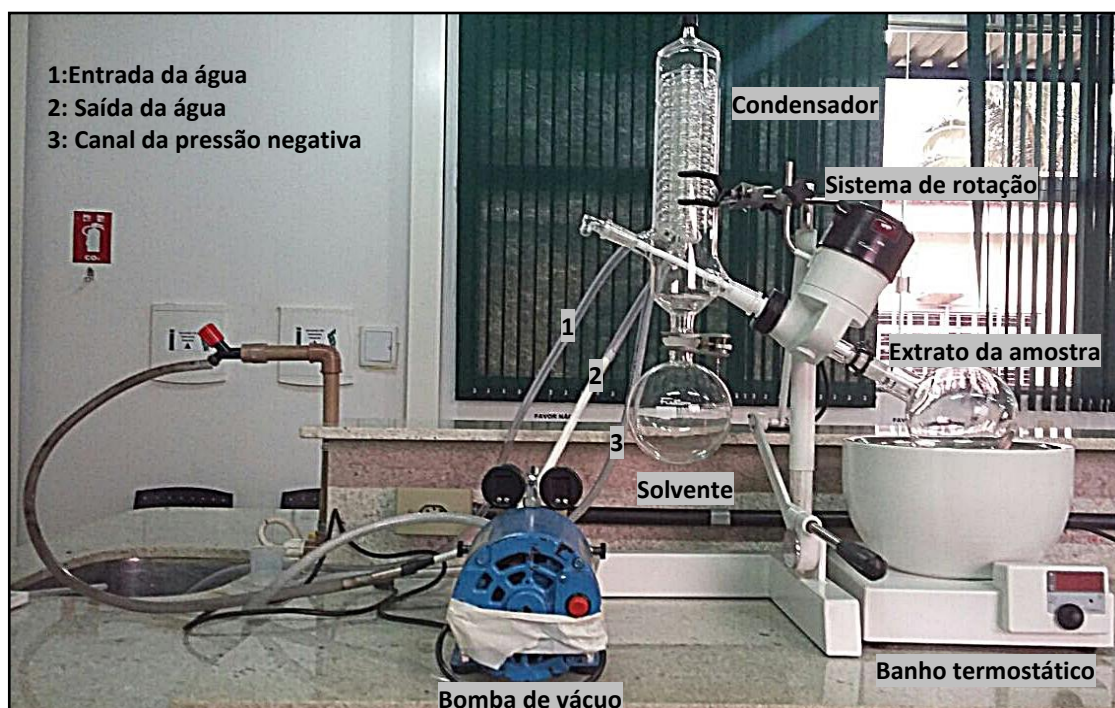
A extração se deu por um sistema de arraste, em que o solvente era aquecido e ao alcançar 68 °C este passava do estado líquido para gasoso e evaporava, passando por um canal (indicado por setas verdes) até alcançar o

condensador, onde era resfriado, retornando ao estado líquido e lavando o material sólido (farinha) contido no cartucho de papel filtro e acumulando dentro do soxhlet.

Ao atingir o meio do soxhlet ou acima da curvatura superior do canal que dar acesso ao balão volumétrico (indicado por setas roxas), por gravidade, a mistura retornava ao balão completando o ciclo, que se repetia diversas vezes no intervalo de tempo proposto.

O rotaevaporador (Figura 2) foi utilizado para separar o óleo do *n*-hexano, em rotação de 80 rpm da amostra em um banho termostatizado na temperatura entre 75 e 80 C°, sob pressão de 300 mmHg, a qual controlou-se mediante associação de uma bomba de vácuo ao equipamento.

Figura 2 - Rotaevaporador



Fonte: Melo, 2017.

Ao final, o óleo foi retirado com o auxílio de uma pipeta de 20ml, transferido para um recipiente de vidro âmbar e armazenado sob temperatura controlada (27°C em média) até a montagem dos ensaios.

3.4 Ensaio biológico

A metodologia para o ensaio biológico foi proposta originalmente por Levan em 1938 e foi reproduzida neste trabalho com modificações. Foram

feitos um total de 4 tratamentos com o óleo que diferenciavam-se pelo período de exposição a ele puro e seus 4 tratamentos controle, sendo um pra cada período, da forma apresentada abaixo e foram mantidos em temperatura ambiente e luminosidade controlada:

- T1: Exposição em óleo puro por 12 horas;
- T2: Exposição em água mineral por 12 horas (controle negativo);
- T3: Exposição em óleo puro por 24 horas;
- T4: Exposição em água mineral por 24 horas (controle negativo);
- T5: Exposição em óleo puro por 36 horas;
- T6: Exposição em água mineral por 36 horas (controle negativo);
- T7: Exposição em óleo puro por 48 horas;
- T8: Exposição em água mineral por 48 horas (controle negativo);

Considerando que algumas cebolas poderiam não germinar ou germinarem de maneira desuniforme, 250 unidades foram montadas em água, onde cada uma foi colocada em um recipiente (pote coletor) com capacidade para 50ml onde colocou-se água em quantidade suficiente para submergir a base do bulbo (prato) estando suspensos pela borda do recipiente e para o crescimento das raízes, como evidencia a figura 3. Os bulbos das cebolas foram mantidos em água até que a quantidade mínima de raízes necessária para a montagem de um tratamento (18 raízes) alcançassem 10 a 15 mm de comprimento.

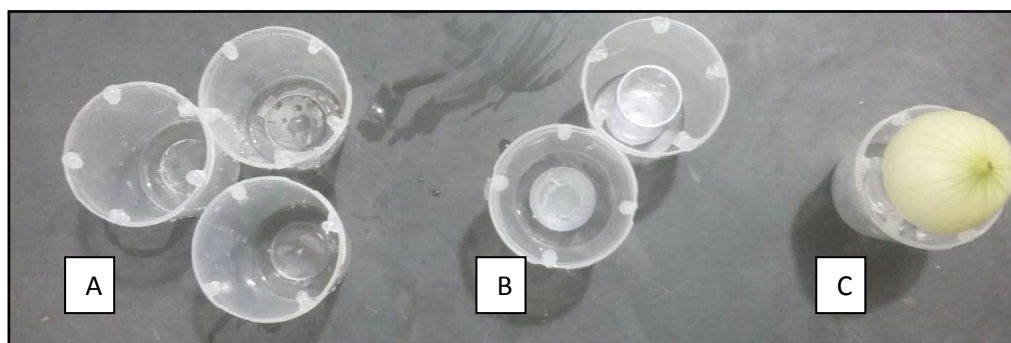
Figura 3 - Cebolas expostas em água para emissão das raízes



Fonte: Melo, 2017.

Para evitar lesões às cebolas e consequentemente o desenvolvimento de compostos que pudessem interferir na leitura dos resultados dos testes, na borda dos coletores foi colocado cola quente, a qual após esfriar e secar promovia base de contato menos abrasiva (figura 4).

Figura 4 - Recipiente com cola nas bordas (A), como cola e pote J10 no interior (B) e como cola e pote J10 no interior com bulbo



Fonte: Melo, 2017.

Posteriormente foram transferidas para seus respectivos tratamentos, em frascos cristal J10 fixados no interior dos coletores utilizados para germinação, com a finalidade de estabilizar os bulbos. Desta forma permaneceram por períodos pré-definidos (12, 24, 36 e 48 horas), um tratamento por vez, como ilustrado na Figura 5.

Figura 5 - Montagem do tratamento 1 e controle 1



Fonte: Melo, 2017.

Nos tratamentos de controle negativo utilizou-se somente água destilada, sendo um tratamento controle para cada período, ou seja, um controle no qual as raízes foram submersas em água por 12 horas, outro por 24, 36 e 48 horas consecutivamente. Todos os tratamentos, inclusive os controles foram aplicados em 18 bulbos, sendo todos utilizados para análise, considerando cada 3 unidades uma repetição

O arranjo fatorial utilizado foi o 2x4, sendo óleo puro e água destilada (controle negativo) e quatro diferentes períodos de exposição. No que se refere ao delineamento experimental, o experimento foi conduzido um tratamento por vez em paralelo ao seu respectivo controle, onde cada período

teve 3 blocos com 3 bulbos cada, totalizando 9 bulbos cada período. Ao final, todo o experimento foi aplicado a 72 cebolas.

Após os tratamentos, extraíram-se os ápices radiculares de todas as raízes de comprimento ≥ 15 mm e ≤ 20 mm de cada bulbo, e então fixados em solução etanol absoluto: ácido acético (3:1) por 24 horas em *eppendorfs* previamente identificados. No término deste período foram transportadas para *eppendorfs* com álcool etílico a 70% também identificados e então acondicionados em refrigerador até o dia das análises citogenéticas (BARBERIO, 2009).

3.5 Análise das células mitóticas de *Allium cepa*

A análise das células mitóticas foi feita de acordo com a metodologia proposta por Guerra e Souza (2002). As raízes que estavam acondicionadas em álcool 70% foram lavadas, sendo imersas duas vezes em água destilada com duração de 5 minutos cada imersão. Posteriormente as raízes foram enxugadas rapidamente em papel de filtro e mergulhadas em HCl 1N à temperatura ambiente e mantidas nesta solução por 11 minutos, para promover a hidrólise do material e possibilitar a visualização do material genético. Ao final as raízes foram imersas em ácido acético 45% por no mínimo 1 minuto.

Para a montagem das lâminas, transferiu-se uma ponta de raiz para cada lâmina, onde uma gota de ácido acético a 45% havia sido previamente adicionada. Foi retirado somente o meristema radicular com agulha histológica e auxílio de um estereomicroscópio, descartando o restante do material. Com 2 agulhas rombudas, ainda com auxílio do estereomicroscópio, fragmentou-se o meristema até o material formasse uma pequena mancha de tecido espalhado.

Em seguida foi adicionada uma gota de corante Violeta Genciana a 0,20% e 4 minutos após, depositado uma lamínula sobre o material e envolto em papel filtro, seguida de esmagamento mediante pressão sobre o conjunto lâmina/lamínula de modo a não movimentar a lamínula sobre o material da lâmina (esqueche).

3.6 Avaliação citotóxica do óleo natural da semente do nim no meristema radicular da *Allium cepa*

Foram analisadas células de 3 raízes de cada bulbo. Nas lâminas observou e considerou-se as células em interfase e divisão celular mitótica para calcular o Índice Mitótico (IM), assim como a presença de anomalias como pontes cromossômicas, cromossomos metafásicos desorganizados e micronúcleos (TEDESCO *et al.*, 2012). Para análise utilizou-se microscópio óptica com lente objetiva de 40x, para observação e avaliação.

3.7 Análise estatística

Para obter o IM (índice mitótico) foi utilizada a equação $IM = (m/T) \times 100$, onde m consiste no número de células em mitose e T é o número total de células analisadas (IGANCI *et al.*, 2006), assim como média de ocorrência de anomalias.

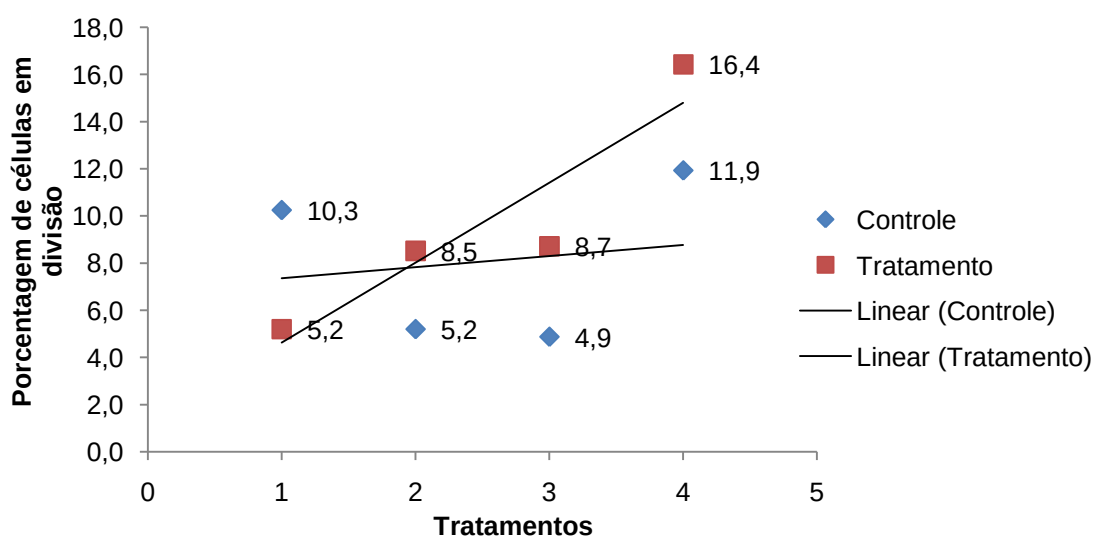
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparado ao controle negativo, o tratamento 1 (12 horas) apresentou interferência significativa no IM das raízes analisadas, reduzindo de 10,3% (controle 1 - 12 horas) para 5,2% sob tratamento com o óleo. Já nos demais tratamentos houve um aumento relevante se comparado aos seus respectivos controles.

Leme e Marin-Morales (2009) propõem que algumas substâncias podem interferir no índice mitótico celular, podendo reduzi-lo ou elevá-lo, o que pode afetar negativamente o crescimento e desenvolvimento do organismo. O aumento do índice mitótico resulta na intensificação da divisão celular, a qual tende a ser prejudicial às células, por propiciar a proliferação destas de forma desordenada e, conseqüentemente, a formação de tumores.

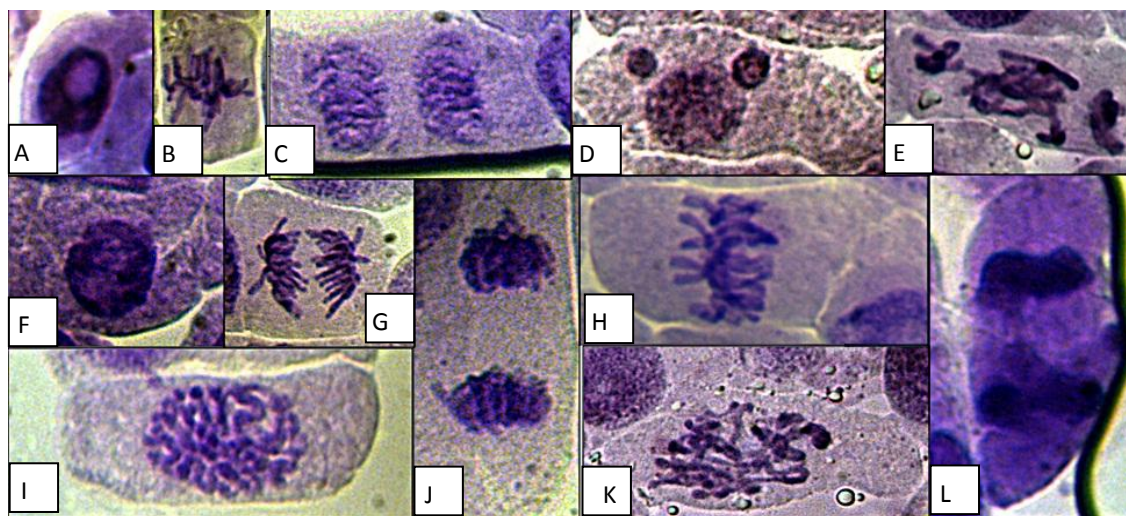
O Gráfico 1 evidencia que os tratamentos 2 (24 horas), 3(36 horas) e 4(48 horas) comparado aos controles de mesmo período, apresentaram um aumento no IM de 5,2, 4,9 e 11,9% para 8,5, 8,7 e 26,4 respectivamente.

Gráfico 1- Índice mitótico (IM)



Diante disso e dos dados obtidos, é possível aferir que o óleo da semente do nim no ciclo celular das raízes de *A. cepa*, apresenta citotoxicidade, por comprometer o desenvolvimento do organismo de acordo com Pereira (2015).

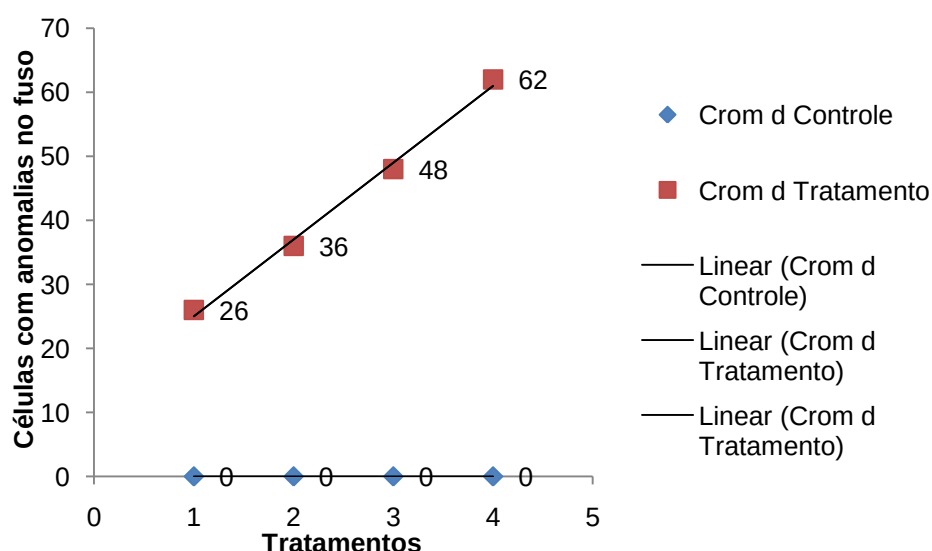
Figura 6 – interfase normal A e F, prófase normal I, metáfase B e H, anáfase G, telófase c e J, ponte cromossômica L, anomalia no fuso E e K, micronúcleos D;



Fonte: Melo, 2017.

O gráfico 2 evidencia a quantidade de anomalias do fuso presentes nas células do tratamento com óleo de nim e no controle, o qual foi determinado pela desorganização dos cromossomos dentro da célula. Anormalidades no fuso semelhantes também foram obtidas por Almeida (2014) para o látex de *Hancornia speciosa*, e denominado com atraso. Machado (2013) também obteve esta mesma anormalidade em testes para efluente do terminal Petroquímicos Almirante Soares Dutra Osório – RS.

Gráfico 2- Células com anomalias no fuso evidenciado pela desorganização dos cromossomos



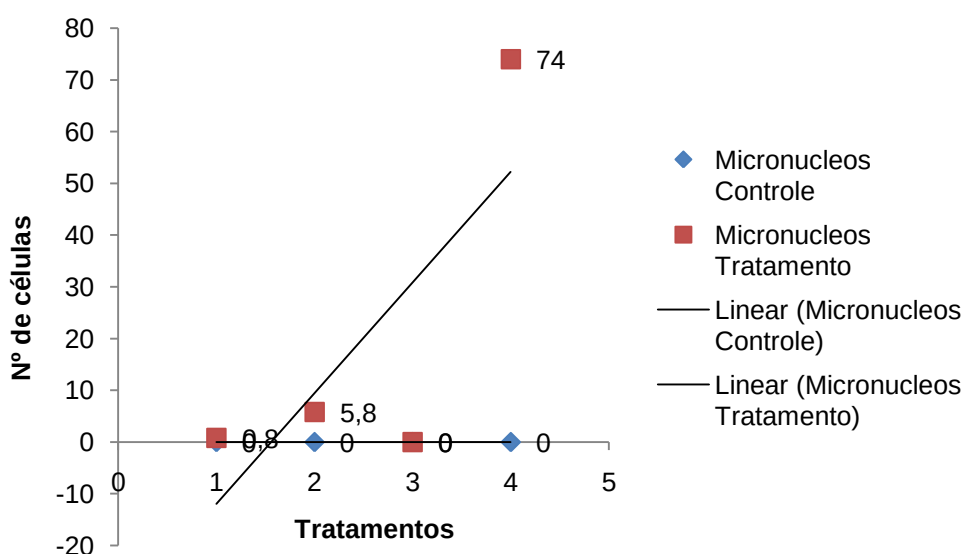
O fuso consiste no local de fixação dos cromossomos e atua na organização, orientação e distribuição dos cromossomos para pólos opostos da célula durante o ciclo de divisão celular (Andrade, 2012). Diante desta

prerrogativa, é sabido que diante do não funcionamento normal do fuso, metáfase, anáfase e telófase não acontecem de forma correta, podendo ser letal para a célula.

Brito e Luz (2015) afirmam que, além de interferir no IM, algumas substâncias, denominadas agentes genotóxicos (que podem ser físicos, químicos ou biológicos) desestabilizam a organização do DNA dos organismos vivos, provocando alterações cromossômicas clastogênicos, aneugênicos e mutagênicos, que são quebras na estrutura do material genético, alterações no número de cromossomos e mutações no DNA a nível de genes respectivamente, causando morte celular.

Outra anomalia resultante da interferência do óleo foi a formação de micronúcleos. Contudo, somente nos tratamentos 2 e 4 notou-se esta ocorrência, demonstrado na Gráfico 3. Considerando que nos tratamentos controle não tenha ocorrido nenhum micronúcleo entre as células analisadas, atribui-se então estas anomalias à influência citotóxica do óleo.

Gráfico 3- Formação de micronúcleos



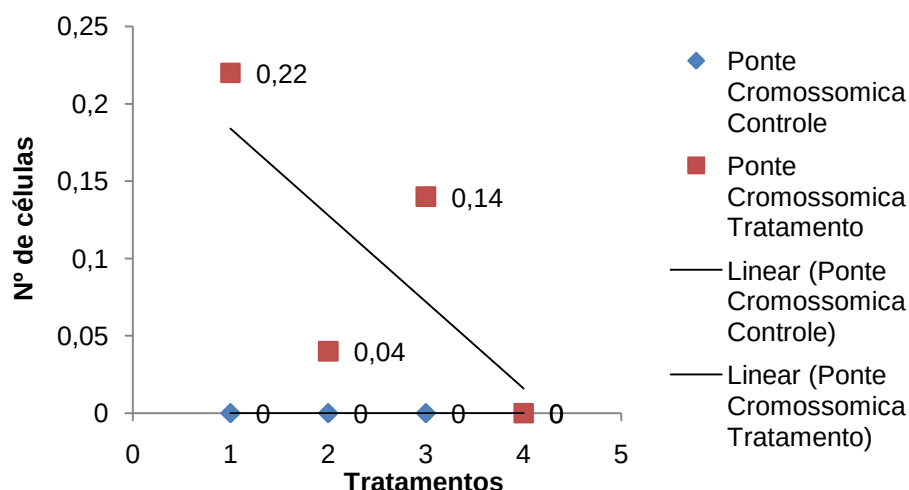
Pohren *et al.* (2013), Siddiqui *et al.* (2011) e Moura (2011) obtiveram formação de micronúcleos para teste com solo contaminado com metais pesados, águas residuais industriais e extrato pirolenhoso de *Tectona grandis* respectivamente em decorrência de mutações cromossômicas induzidas por estas substâncias. Baesse *et al.* (2016) afirma que a formação de micronúcleo é

utilizada em epidemiologia molecular como um biomarcador para determinar a ocorrência de danos cromossômicos e instabilidade genômica, ou seja, intimamente ligado a carcinogênese.

A incidência de pontes cromossômicas (Gráfico 4) foi de 0,22 por repetição de tratamento no tratamento 1 e 0,14 no tratamento 3, sendo estas as maiores freqüências obtidas, no entanto, nos tratamentos controles não ocorreu nenhuma formação desta anomalia.

Embora tenha ocorrido em baixa freqüência, a presença de ponte cromossômica é importante. Leme e Marin-Morales (2009) apontam que ruptura ou perda cromossômica, que induzem a aneuploidia e poliploidia, estão relacionadas às pontes cromossômicas.

Gráfico 4 – Quantitativo de pontes cromossômicas



Maceda (2014) obteve quantidade significativa de pontes cromossômicas para teste com águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante – MS, Brasil, e Silva *et al*, (2015) para extrato aquoso de arruda (*Ruta graveolens* L.) e confrei (*Symphytum officinale* L.), conferindo às substâncias testadas genototoxicidade.

Além das anomalias citadas, percebeu-se ainda diante das análises citogenéticas das raízes submetidas ao óleo da semente do nim, que estas não completavam o ciclo de divisão celular, evidenciado pela ausência total de células em metáfase, anáfase e telófase, o que incita aferir um grau de citotoxicidade elevada, e ainda, mesmo sem teste de toxicidade, que por vez se dá pela mensuração das raízes antes e depois de submeter ao tratamento

pra cálculo de índice de crescimento, que este inibiu o crescimento das raízes, ou seja, apresenta-se tóxico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo da semente do nim nas condições testadas mostrou-se tóxico, citotóxico e genotóxico, chamando uma maior atenção quanto a seu uso e aplicação, assim como, a utilização de EPI para manuseá-lo, inclusive em aplicações no campo pois, com base nos resultados obtidos por Teixeira *et al.* (2003) em testes paralelos com células animal e vegetal, os dados aqui apresentados podem ser considerados, em grau menor, para aferir tal citotoxicidade às células animais.

Contudo, é importante repetir este estudo, para avaliar a citotoxicidade em função das concentrações e também utilizar células animais como sistema teste.

REFERÊNCIAS:

ACOSTA, J. I.; VIETO, E.; LÓPEZ, Z.; NÚÑEZ, Y. Eficacia de las hojas del nim (*Azadirachta indica*) en el control de nemátodos gastrointestinales en cabras. **Ciencia y Tecnología Ganadera**, v. 6, n. 2, p. 79-83, 2012. Disponível em: http://www.cima-minag.cu/wa_files/Vol_6_282_2912Jorge.pdf. Acesso em: 08 out. 2016.

ANDRADE, B. R. G. **Estudo do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico em células de *Allium cepa* da parationa metilica antes e após aplicação dos processos uv e uv/h2o2**. 194f. 2012. Tese (Doutor em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ. 2012. Disponível em: <http://www.revistarevinter.com.br/autores/index.php/toxicologia/article/viewFile/173/390> Acesso em: 27 nov. 2017.

ARAÚJO, S. A. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MIRANDA, A. M.; LIMA, F. E. S.; MELO, V. S. P.; RICARTE, A. R. F.; COSTA, E. C. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, v. 18, n. 1, p. 25-31, 2008. Disponível em: <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/Artigo3.2008.1.pdf>. Acesso em: 08 out. 2016.

AWASTHY, K. S.; CHAURASIA, O. P.; SINHA, S. P.; Prolonged murine genotoxic effects of crude extracted from neem. **Phytotherapy research**. 13(1): 81-83. Badr A, Ghareeb. 1999. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)10991573\(199902\)13:1%3C81::AID-PTR385%3E3.0.CO;2-W/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)10991573(199902)13:1%3C81::AID-PTR385%3E3.0.CO;2-W/full). Acesso em: 27 dez. 2016.

AYRES, M. **Bioestat: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. (Brasília: Sociedade Civil Mamirauá), 2003. Disponível em: <http://euler.mat.ufrgs.br/~giacomo/Manuais-softw/BIOESTAT/Manual-BioEstat.pdf>. Acesso em: 08 out. 2016.

AZEVEDO, A. I. B.; LIRAA, S.; CUNHAL, C.; ALMEIDA, F. A. C.; RAUL P. DE ALMEIDA, R. P. Bioatividade do óleo de nim sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 3, p. 309-313, 2010. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Raul_Almeida2/publication/216802812_Bioatividade_do_oleo_de_nim_sobre_Alphitobius_diaperinus_Coleoptera_Tenebrionidae_em_sementes_de_amendoim/links/0488e6eb1cb44a6c0b243ed5/Bioatividade-do-oleo-de-nim-sobre-Alphitobius-diaperinus-Coleoptera-Tenebrionidae-em-sementes-de-amendoim.pdf. Acesso em: 14 ago. 2016.

BAESSE, C. Q.; PANIAGO, L. P. M.; SANTOS, Y. R.; RIBEIRO, P. V. A., TOLENTINO, V. C. M.; FERREIRA, G. Análise de micronúcleos em *Antilophia galeata lichtenstein*, 1823 (Passeriformes: Pipridae) em ambiente florestal com influência urbana. **INVESTIGAÇÃO**, v. 15, n. 5, 2016. Disponível em:

<<http://www.pet.famev.ufu.br/sites/pet.famev.ufu.br/files/CADERNO%20DE%20RESUMOS%20atualizado.pdf#page=11>> Acesso em: 23 nov. 2017.

BARBERIO, A. **Efeitos citotóxicos e genotóxicos no meristema radicular de *Allium cepa* exposta a água do Rio Paraíba do Sul-estado de São Paulo-regiões de Tremembe e Aparecida**. 2009. 98 f. Tese (Doutor em Biologia Celular e Estrutural) - Instituto de biologia.Universidade de Campinas. 2009. Disponível em:
<<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=000442665&fd=y>>
Acesso em: 12 dez. 2016.

BENÍCIO, D. A.; NETO, V. Q.; SOUSA, J. G. Avaliação das propriedades físico-químicas e da composição química parcial do óleo de sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss), cultivado no município de Patos-Paraíba. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 4, n. 2, 2010. Disponível em:
<http://sites.uepb.edu.br/biofar/download/v4n22010/AVALIACAO_DAS_PROPRIEDADES_F%C3%8DSICO-QUIMICAS_E_DA_COMPOSICAO.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2016.

BEZERRA, C. M.; DINELLY, C. M. N.; OLIVEIRA, M. A. S. avaliação da toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade do infuso de Malva-santa (*Plectranthus barbatus*-Lamiaceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 13, n. 4, p. 220-228, 2016. Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/REF/article/view/36887/pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2017.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R. K.; & BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current science-Bangalore**-, v. 82, n. 11, p. 1336-1345, 2002. Disponível em: <<http://repository.ias.ac.in/5193/1/305.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2016.

BRASIL, R. B. Aspectos botânicos, usos tradicionais e potencialidades de *Azadirachta indica* (neem). **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17; p. 2013. Disponível em:
<<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013b/MULTIDISCIPLINAR/Aspectos.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2017.

BRITO, O. S. **Efeitos do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre a reprodução e perfil metabólico de machos ovinos**. 2013. 92 f. Tese (Doctor Scientiae em Zootecnia)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, 2013. Disponível em:
<<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/8051/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 10 set. 2016.

BROGLIO-MICHELETTI, S. M. F.; DIAS, N. S.; VALENTE, E. C. N.; SOUZA, L. A.; LOPES, D. O. P.; SANTOS, J. M. Ação de extrato e óleo de nim no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em laboratório. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 1, p. 44-

48, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpv/v19n1/a09v19n1.pdf>>. Acesso em: 23 set. 2016.

BUZATTI, A.; SPRENGER, L.K.; KUCHARSKY, T.; MACELO, B. M. Ação do óleo de nim frente à teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em testes in vitro. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n. 3, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/287594137_ACAO_DO_OLEO_DE_NIM_FRENTE_A_TELEOGINAS_DE_RHIPICEPHALUS_BOOPHILUS_MICROPLUS_EM_TESTES_IN_VITRO>. Acesso em: 19 out. 2016.

CHAGAS, A. C. S.; VIEIRA, L. S. Ação de *Azadirachta indica* (Neem) em nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 44, n. 1, p. 49-55, 2007. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26661/28444>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

COSTA, A. C., DOMINGUES, G., DÜSMAN, E., DE ALMEIDA, I. V., & VICENTINI, V. E. P. Citotoxicidade das águas do Rio do Peixe (São Paulo-Brasil), em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa* L. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 31, n. 1, p. 248-258, Jan./Feb. 2015. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/15069/15900>>. Acesso em: 19 out. 2016.

CREMONEZ, F. E., TESSELE, A., MISSIO, R. F., CREMONEZ, P. A., & MIRANDA, V. T. Estádios de maturação de frutos de pinhão manso visando maior rendimento no teor de óleo. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 6, n. 5, 2017. Disponível em: <<http://revistas.ufpr.br/rber/article/view/51878>>. Acesso em: 08 dez. 2017.

DELEITO, C. P. R.; BORJA, G. E. M.; Nim (*Azadirachta indica*): uma alternativa no controle de moscas na pecuária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 293-298, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v28n6/06.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

DIAS-ARIEIRA, C. R.; FERREIRA, L. D. R., ARIEIRA, J. D. O.; MIGUEL, E. G.; DONEGA, M. A.; RIBEIRO, R. C. F. Atividade do óleo de *Eucalyptus citriodora* e *Azadirachta indica* no controle de *Colletotrichum acutatum* em morangueiro. **Summa phytopathologica**, v. 36, n. 3, p. 228-232, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/sp/v36n3/v36n3a07.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2016.

FERNANDES, J. I.; CORREIA, T. R.; RIBEIRO, F. A.; CID, Y. P.; TAVARES, P. V.; SCOTT, F. B. Eficácia do Nim (*Azadirachta indica*) no controle de *Otodectes cynotis* (Hering, 1838) em cães. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 32, n. Supl 1, p. 55-58, 2010. Disponível em: <http://www.rbmv.com.br/pdf_artigos/06-10-2011_13-57Suple012.pdf> Acesso em 01 dez. 2017.

FORIM, M. R. **Estudo Fitoquímico do Enxerto de *Azadirachta indica* sobre a *Melia azadirach*: Quantificação de substâncias inseticidas**. 2006. 332 f. Tese (doutorado em Ciências, Área: Química Orgânica e sub-área: Produtos Naturais) –Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Química. 2006. Disponível em: < <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp027234.pdf> >. Acesso em: 14 de fev. 2017.

GARCIA, J. L. M. **O nim indiano: o bioprotetor natural**. Série Agricultura Alternativa. Junho. 2000. Disponível em: <<https://tudosobreplantas.wordpress.com/2012/02/03/o-nim-indiano-o-bioprotetor-natural/>>. Acesso em: 08 jan. 2017.

GONÇALVES-GERVÁSIO, R. C. R. **Efeito dos extratos de *Tichilla pallida* Swartz e *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae) sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) e seu parasitóide *Trichogamma pretiosum* Riley**. 2003. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências, Área de Concentração: Entomologia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo. 2003. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/11/11146/tde-10022004-151703/en.php>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

GRIPPA, G. A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S. T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. Revista Brasileira de Toxicologia. V. 23 (2), 2010, p. 11-16.

GUERRA, M.; SOUZA, M.J. **Como observar cromossomos: Um guia de técnicas em itogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto. Ed. Funpec, 2002. Disponível em: <http://www.ensp.fiocruz.br/portal-ensp/_uploads/documentos-pessoais/documento-pessoal_52172.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2017.

KUMAR, P. S.; MISHRA, D.; GHOSH, G.; PANDA, C. S. Biological action and medicinal properties of various constituent of *Azadirachta indica* (Meliaceae): an overview. In: BRITO, O. S. **Efeitos do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre a reprodução e perfil metabólico de machos ovinos**. 2013. 92 f. Tese (Doctor Scientiae em Zootecnia)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa MG, 2013. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/8051/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 10 Set. 2016

LALE, N.E.S.; ABDULRAHMAN, H.T. Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seed oil obtained by different methods and neem powder for the management of *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. **Journal of Stored Products Research**, v.35, p.135-143, 1999. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/223856317_Evaluation_of_neem_Azadirachta_indica_A_Juss_seed_oil_obtained_by_different_methods_and_neem_powder_for_the_management_of_Callosobruchus_maculatus_F_Coleoptera_Bruchidae_in_stored_cowpea>. Acesso em: 24 dez. 2016.

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, vol. 24, n4, p 471-486. 1938. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-5223.1938.tb03221.x/full>> Acesso em: 14 set. 2016.

MACEDA, E. B.; GRISOLIA, A. B.; VAINI, J. O.; CANDIDO, L. S. Uso de biomarcadores para monitoramento das águas do Córrego Arara no município de Rio Brilhante, MS, Brasil. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 10, n. 1, 2015. Disponível em: <http://www.redalyc.org/html/928/92832874011/>> Acesso em 22 nov. 2017.

MACHADO, A. T. **Avaliação do potencial mutagênico do efluente do Terminal Petroquímico Almirante Soares Dutra (Osório-RS-Brasil) através do sistema teste de *Allium cepa***. 45f. 2013. Monografia (Bacharel em Ciências Biológicas: Ênfase em Biologia Marinha e Costeira) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Imbé/RS. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/80497>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

MARCOMINI, A. M.; ALVES, L. F. A.; BONINI, A. K.; MERTZ, N. R.; SANTOS, J. D. Atividade inseticida de extratos vegetais e do óleo de nim sobre adultos de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera, Tenebrionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 3, p. 409-416, 2009. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Luis_Alves12/publication/267767317_Atividade_inseticida_de_extratos_vegetais_e_do_oleo_de_nim_sobre_adultos_de_Alphitobius_diaperinus_Panzer_Coleoptera_Tenebrionidae/links/5589421d08ae6d4f27ea42a5/Atividade-inseticida-de-extratos-vegetais-e-do-oleo-de-nim-sobre-adultos-de-Alphitobius-diaperinus-Panzer-Coleoptera-Tenebrionidae.pdf>. Acesso em:

MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo de Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1675-1680, 2004. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782004000600002>. Acesso em: 12 out. 2016

MARTINEZ, S. S. O Nim – *Azadirachta indica* – natureza, usos múltiplos, produção. **Londrina: IAPAR**, 2. ed. 142p, 2002. Disponível em: http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/O%20NimDownloadFev2008PDF.pdf>. Acesso em: 12 out. 2016.

MARTINS, M. N. C. **Análise do potencial genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto em *Allium cepa***. 2015. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Espírito Santo. Disponível em: <http://dspace2.ufes.br/jspui/handle/10/5122>> Acesso em 23 nov. 2017.

MEDICE, R.; BETTIOL, W.; ALTÉA, U. Q. M. Efeito de bicarbonato de potássio sobre a severidade do oídio em plantas de soja. **Summa Phytopathologica**,

. vol.39. n.1. Botucatu. Jan./Mar. p. 35-39, 2013. Disponível em:
<<http://200.145.6.238/handle/11449/27715>> Acesso em 01 dez. 2017.

MELO, N. J. S. **Potencial tóxico, citotóxico e mutagênico de extratos aquosos de *Licania rigida* (Chrysobalanaceae) em células in vivo.** 2015. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Semi Árido. 2015. Mossoró, RN. Fev, 2015. Disponível em: <<https://ppgpa.ufersa.edu.br/wp-content/uploads/sites/60/2014/10/DISSERTA%C3%87%C3%83O-NAAMA-JESSICA-DE-ASSIS-MELO.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2016.

MOREIRA, C. N. B. MOREIRA, **Efeito de extrato aquoso de folhas de nim (*Azadirachta indica*) sobre *Fusarium solani* em mudas de mamoeiro.** 2017. 34 f. Monografia (Bacharel em Agronomia) Centro de Ciências Agrárias e Ambiental da Universidade Federal do Maranhão, Chapadinha MA, 2017. Disponível em: <<https://monografias.ufma.br/jspui/handle/123456789/1389>> Acesso em: 01 dez. 2017.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): múltiplos usos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 24, n. 1, p. 139-148, 2005. Disponível em:
<[http://xa.yimg.com/kq/groups/4981631/2130324013/name/A+%C3%A1rvore+Nim+\(Azadirachta+indica+A.+Juss\).pdf](http://xa.yimg.com/kq/groups/4981631/2130324013/name/A+%C3%A1rvore+Nim+(Azadirachta+indica+A.+Juss).pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2016.

MOURA, R. T.; KARSBURG, I. V. **Citogenotoxicidade do licor pirolenhoso de *Tectona grandis* pelo *Allium cepa*.** 2011, 11p. Monografia (Bacharelado em Engenharia Florestal)- Universidade do Estado de Mato Grosso, Alta Floresta. Disponível em:<
<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015b/biologicas/potencial%20mutagenico.pdf>> Acesso em: 23 nov. 2017.

NEVES, B. P.; OLIVEIRA, I. P.; NOGUEIRA, J. C. M. Cultivo e utilização do Nim Indiano. **Embrapa Arroz e Feijão**, Santo Antônio de Goiás. 2003. 12 p. n. 62.(Circular Técnica). Disponível em:
<http://guapore.cnptia.embrapa.br/transferencia/informacoestecnicas/publicacaoesonline/circular tecnica_62.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2016.

NEVES, E. J. M. Importância dos fatores edafo-climáticos para o uso do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) em programas florestais e agroflorestais nas diferentes regiões do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, Piracicaba, n.49, p.99-107, 2004. Disponível em:<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF200909/39095/1/Pag_99_107.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2016.

NOGUEIRA, D. M.; JÚNIOR, E. V. H.; BARROS, R. A. P.; PEIXOTO, R. M.; PAULO R. M.; CAMPOS, P. R. M. Avaliação da eficácia do óleo de Nim (*Azadirachta indica*) no controle de endoparasitoses gastrintestinais de caprinos criados em sistema de produção orgânica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA, 3, 2005. Florianópolis. **Anais**. Florianópolis. CD-ROM, 2005. Disponível em:

<http://www.cpatas.embrapa.br/public_eletronica/downloads/OPB103.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2017.

OLIVEIRA, J. D.; VENDRAMIM, J. D. Repelência de óleos essenciais e pós vegetais sobre adultos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) em sementes de feijoeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28, n. 3, p. 549-555, 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/aseb/v28n3/v28n3a26.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

PAES, J. B.; SOUZA, A. D.; LIMA, C. R.; SANTANA, G. M. Rendimento e características físicas dos óleos de nim (*Azadirachta indica*) e mamona (*Ricinus communis*). **Floresta e Ambiente**. 22(1):134-139, 2015. Disponível em: <http://www.sifloresta.ufv.br/bitstream/handle/123456789/15738/Revista_Floresta_e_Ambiente_v22_n1_p134-139_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 22 nov. 2016.

PAIVA, L. J. M.; NEVES, M. F. Controle Orgânico de Parasitas. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 12, p. 1-8, 2009. Disponível em: <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/eOo2euvzCHBTGof_2013-6-19-16-8-28.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2017.

PEDRO, J. **Deteccção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa***. 2016. 104 f. Dissertação. Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2008. Disponível em: <http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/87704/pedro_j_me_rcla.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 29 set. 2016.

PEREIRA, A. S. **Avaliação do potencial mutagênico da água de retorno das lavouras de arroz de Capivarido Sul (Rio Capivari, RS), através do sistema teste *Allium cepa***. 2015. 41f. Dissertação (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Imbé/RS. 2015. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/140142> Acesso em: 27 nov. 2017.

PERGO, E.M., ISHII-IWAMOTO, E.L. Changes in energy metabolism and antioxidant defense systems during seed germination of the weed species *Ipomoea triloba* L. and the responses to allelochemicals. **Journal of Chemical Ecology**, v.37, p.500-513, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10886-011-9945-0>> Acesso em: 27 nov. 2017.

PIO-CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura, v. 2, p. 259-263, 1984. Disponível em: <<https://www.livrebooks.com.br/livros/diccionario-das-plantas-uteis-do-brasil-e-das-exoticas-cultivadas-lkxyvgaacaaj/baixar-ebook>>. Acesso em: 02 set. 2016.

POHREN, R. de S.; COSTA, T. P. da.; VARGAS, V. M. F. Investigation of sensitivity of the *Allium cepa* test as an alert system to evaluate the genotoxic potential of Soil contaminated by heavy metals. **Water Air Soil Pollut**, v. 224, p. 1460- 1470, 2013..Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11270-013-1460-1>> Acesso em: 27 nov. 2017.

RIBEIRO, T. P. **Avaliação da biocompatibilidade e potencial angiogênico do látex de *Hancornia speciosa***. 67f. 2014. Dissertação (Mestre em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Goiás. Ipameri/GO. Disponível em: <http://www.cdn.ueg.br/source/ppgpv/conteudoN/4630/Dissertao__Thuanne_Pires_Ribeiro.pdf> Acesso em: 27 nov. 2017.

ROEL, A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o desenvolvimento rural sustentável. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**. v. 1, n. 2, p. 43-50, 2001. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/284058086_Utilizacao_de_plantas_com_propriedades_inseticidas_uma_contribuicao_para_o_Developolvimento_Rural_Sustentavel>. Acesso em: 03 out. 2016.

SANTOS, A.V; OLIVEIRA, R.A; ALBUQUERQUE, G.R. Efeito in vitro do Extrato de Nim (*Azadirachta Indica*) e Óleo Essencial de Cravo (*Syzygium Aromaticum*) Sobre *Rhipicephalus (boophilus) microplus*. **Revista Brasileira Medicina Vet.erinária**, 34(2):111-115, abr/jun 2012. Disponível em: <http://www.rbmv.com.br/pdf_artigos/27-08-2012_12-36RBMV%20008.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2017.

SANTOS, L. P.; FIORATTI, C. A. G.; SILVA, R. M.; MORAIS, K.; MUSSURY, R. M. Bioatividade do Extrato Aquoso de Jacaranda decurrens subsp *Symnetrifoliolata* (Bignoniaceae) sobre *Plutella xylostella* (L., 1758)(LEPIDOPTERA: PLUTELLIDAE). **Cadernos de Agroecologia**, v. 11, n. 2, 2017.Disponível em: <<http://aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/cad/article/view/21724/12580>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

SANTOS, M. R. A.; SILVA, A. G.; LIMA, R. A.; LIMA, D. K. S.; SALLET, L. A. P.; TEIXEIRA, C. A. D.; FACUNDO, V. A. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, p. 319-324, 2010. Disponível em: <<http://scielo.br/pdf/rbb/v33n2/a12v33n2.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2017.

SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. **Annual review of entomology**, v. 35, n. 1, p. 271-297, 1990. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.en.35.010190.001415?journalCode=ento>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

SIDDIQUI, A. H.; TABREZ, S.; AHMAD, M. Validation of plant based bioassays for the toxicity testing of Indian waters. *Environ Monit Assess*, v. 179,p. 241-253, 2011.Disponível em:<

<http://www.springerlink.com/index/6756M17751L22V54.pdf>> Acesso em: 27 nov. 2017.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**. 32:143-145. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/%0D/fb/v32n2/08.pdf>> Acesso em: 22 dez. 2016.

SILVA, F. G.; COSTA, E. M.; FERREIRA, R. R.; SILVA, F. E. L.; ARAUJO, E. L. Óleo de nim aplicado via irrigação no controle da mosca minadora em meloeiro. **Agropecuária Científica No Semiárido**, v. 11, n. 2, p. 122-126, 2015. Disponível em: <<http://revistas.ufcg.edu.br/acsa/index.php/ACSA/article/view/676/pdf>>. Acesso 14 dez. 2016.

SILVA, W. C.; FERREIRA, A. A. S.; SILVA ARRUDA, A.; MARQUES, N. E. Análise da toxicidade e genotoxicidade de arruda (*Ruta graveolens* L.) e confrei (*Symphytum officinale* L.) em células meristemáticas de *Allium cepa*. In: **Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE)**(ISSN 2447-8687). 2015. Disponível em:<<http://www.anais.ueg.br/index.php/cepe/article/download/5147/2998>> Acesso em: 22 nov. 2017.

SOUZA, S. A. M.; STEIN, V. C.; CATTELAN, L. V.; BOBROWSKI, V. L.; ROCHA, B. H. G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação de efeitos citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revistas de Biologia e Ciências da Terra**, Belo Horizonte, v.5, n.1, 2005. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/500/50050101.pdf>>. Acesso em: 04 jan. 2017.

SRINIVAS, T.; RAO, M. S.; REDDY, P. S.; REDDY, P. N. Comparative effects of plant extracts and chemicals of the management of leaf spot of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) **Tropical Agriculture**, London, v. 77, p.58-60, 2000. Disponível em:<<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=804187>>. Acesso em: 29 nov. 2016.

SRIVASTAVA R.; GHOSH S.; MANDAL D. B.; AZHAHIANAMBI P.; SINGHAL P. S.; PANDEY N. N.; SWARUP D. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. **Revista Parasitolog**.104:149-153, 2008. Disponível em:<<http://link.springer.com/article/10.1007/s00436-008-1173-3>>. Acesso em: 09 set. 2016.

SURYAWANSHI, J. A. S. Neem - natural contraceptive for male and female-an overview. *Int. J. Biomol. & Biomed*, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2011. Disponível em <<http://www.productosdeneem.com/ebooks/Neem-natura-contraceptive.pdf>>. Acesso em: 24 dez. 2016.

TEIXEIRA, R. O.; LEIVA CAMPAROTO, M. L.; MÁRIO SÉRGIO MANTOVANI, M. S.; VICEN, V. e.p. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**,

v.26, p.551-5, 2003. Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-47572003000400021&script=sci_arttext>. Acesso em: 14 dez. 2016.

XAVIER, A. R.; SILVA, Á. V.; FAVARIM, R., & FEITOSA, J. L. 150-Utilização do extrato aquoso de nim no controle de carrapatos em bovinos. **Cadernos de Agroecologia**, v. 5, n. 1, 2011. Disponível em: <<http://aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/cad/article/view/10343>>. Acesso em: 08 fev. 2017.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLLA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. 3 a ed, Porto Alegre: Mercado Aberto, 2003. Disponível em: <http://www.4shared.com/get/uylmmjRc/biologia_molecular_basica__a_.html?simpleLogin=true&startDownload=true#_=_>. Acesso em: 08 de fev. 2017.