

Estudo toxicológico reprodutivo da *Azadirachta indica* A. Juss. (Neem) em ratas Wistar

Toxicological reproductive study of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) in female Wistar rats

¹Lyra, M. M. A.; ¹Costa-Silva, J. H.; ¹Lima, C. R.; ²Arruda, V. M.; ²Araújo, A. V.; ³Ribeiro e Ribeiro, A.; ³Arruda, A. C.; ²Fraga, M. C. C. A.; ²Lafayette, S. S. L.; ^{1,2,*}Wanderley, A. G.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco; ²Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Pré-Clínica de Produtos Bioativos, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, CCB, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE; ³Departamento de Química, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brasil.

*Correspondência: E-mail: almirgw@ globo.com

Resumo

Os efeitos da administração do óleo das sementes de *Azadirachta indica* (Neem) foram investigados sobre a fase de pré-implantação em ratas Wistar adultas. Três grupos ($n = 5-9/\text{grupo}$) de ratas foram tratados do 1º ao 6º dia de prenhez por via oral com óleo de neem nas doses de 1,0 e 2,0 g/kg de peso. No 20º dia de prenhez procedeu-se à eutanásia e, em seguida, foram determinadas as variáveis reprodutivas: números de fetos vivos e mortos; relação feto/mãe, massa dos fetos, das placentas e dos ovários, número de implantação e reabsorção, número de corpos lúteos e perda de pré e pós-implantação. Os resultados mostram que não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados e controle nas variáveis analisadas, excetuando-se a massa dos fetos que foram reduzidas em relação ao grupo controle em 10,9 e 12,1% respectivamente para as doses de 1,0 e 2,0g/kg. Dessa forma, conclui-se que a administração do óleo de *Azadirachta indica* (Neem) não produziu efeito anti-implante, entretanto a redução da massa fetal pode indicar fetotoxicidade.

Abstract

The effects of the administration of the *Azadirachta indica* (Neem) seed oil was investigated at the pre-implantation stage in Wistar female rats. Three groups ($n = 5-9/\text{group}$) of female adult rats were treated by oral route from the 1st to the 6th day of pregnancy, in the doses of 1,0 and 2,0 g/kg body weight. On the 20th day of pregnancy, the animals were sacrificed for the evaluation of the following reproductive parameters: number of live and non-live conceptuses; relation offspring/mother; fetal weight; placental and ovarian weight; number of total uterine implantation sites; number of resorption sites; number of ovarian corpora lutea; and number of pre- and post-implantation loss. The results show that there were not statistic differences among control and treated groups on the analyzed parameters, except for the fetal weight, that was significantly reduced in relation to the control group by 10,9 and 12,1%, to the doses of 1,0 and 2,0 g/kg, respectively. In conclusion, the administration of the neem seed oil did not induce anti-implantation effect. However, the reduced fetal weight can indicate fetotoxicity independent of the method employed.



Introdução

A família Meliaceae é conhecida por possuir espécies com grande potencial inseticida e repelente (ASIATICO; ZOEBSCH, 1992; COUDRIET; PRABHAKER; MEYERDIRK, 1985; CUBILLO et al., 1994; GÓMEZ et al., 1997; NARDO; COSTA; LOURENÇÃO, 1997). Dentre as espécies mais sistematicamente investigadas por seus efeitos repelentes contra insetos destaca-se a *Azadirachta indica* A. Juss. Essa espécie é encontrada no sul e sudeste da Ásia, Japão, Estados Unidos tropical, América do Sul, Austrália e África (XUAN et al., 2004) e é conhecida popularmente como "neem".

Além do seu uso como repelente principalmente pela população de países tropicais, outras atividades farmacológicas do neem têm sido demonstradas como ação antidiabética (ALAM; SIDDIQUI; HUSAIN, 1990), hipoglicemiante (CHATTOPADHYAY, 1996), anti-ulcerogênica (GARG; NIGAM; OGLE, 1993; RAJI et al., 2004), antimalárica (OBASEKI; JEGEDE FANDUN-SIN, 1986; DHAR et al., 1998), antiparasitária (AHMED; MOSTOFA; AWAL, 1994), anticarcinogênica (BALASENTHIL et al., 1999; DASGUPTA et al., 2004), inseticida (SCHMUTTERER, 1990; ASCHER, 1993) e antiplaca bacteriana (PAI; ACHARYA; UDUPA, 2004). Dentre as formas de utilização da *Azadirachta indica*, o extrato não-aquoso parece ser o mais tóxico enquanto o óleo extraído da semente e o extrato aquoso os menos tóxicos (BOEKE et al., 2004). O extrato das folhas de neem possui propriedade espermicida (KHILLARE; SHRIVASTAV, 2003) e imunocontraceptiva (GARG; TALWAR; UPADHYAY, 1998). Outros efeitos das folhas sobre a reprodução envolvem a diminuição do número, motilidade e malformação dos espermatozoides (PARVEEN et al., 1993; ALADAKATH et al., 2001; KAHN; AWASTHY, 2003), redução funcional do epidídimo (KASTURI et al., 1995), decréscimo no peso da vesícula seminal e próstata (KASTURI et al., 1997).

Em relação aos efeitos tóxicos do óleo das sementes sobre a reprodução, Lal et al. (1987) observaram efeito antifertilidade. A atividade abortiva do óleo purificado das sementes de neem (praneem) em roedores e em primatas também já foi demonstrada (MUKHERJEE, TALWAR, 1996; MUKHERJEE et al., 1996). Dhaliwal et al. (1998) demonstraram que o óleo produzia diminuição da fertilidade em ratas. Por outro lado, Chinnasamy et al. (1993) não encontraram alterações nos parâmetros reprodutivos em animais. Srivastava e Raizada (2001)

investigando o efeito do composto isolado azadiractina (0,5 a 1,5 g/kg via oral) não observaram efeitos teratogênicos, embrio-fetotóxicos ou alteração nas variáveis reprodutivas.

A partir das informações da literatura fica claro que as informações existentes em relação aos efeitos tóxicos do óleo de neem sobre a reprodução são divergentes. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar o possível efeito tóxico do óleo de sementes de neem sobre a fase de pré-implantação em ratas Wistar.

Materiais e Método

Animais

Foram utilizados ratos Wistar, *Rattus norvegicus* var. albinus entre 3-5 e 2-3 meses de idade respectivamente para machos e fêmeas oriundos do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais receberam água e dieta (Labina®) *ad libitum* e foram mantidos sob condições controladas de iluminação (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (22-25 °C). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (Processo nº 23076.006963/2004-71).

Material botânico e extração

O material botânico foi coletado no sítio Ituá - Município de Sto. Antônio do Tauá, Km 29 - Pará em janeiro de 2004. A planta foi identificada e autenticada como *Azadirachta indica* A. Juss. com assistência da Prof.^a Ely Simone Cajueiro Gurgel (Museu Paraense Emílio Goedel, Pará, Brasil). Uma exsicata (MG 133967 RMA 5184) foi depositada no herbário João Mussa Pires da Universidade Federal do Pará, Pará, Brasil.

Utilizou-se uma massa de 2,0 kg de semente de neem, previamente seca e triturada, que foi extraída com 2,0 L de n-Hexano PA, usando-se dois frascos Erlenmeyer. O sistema repousou durante 60 min e foi filtrado a vácuo. Este processo foi repetido por quatro vezes, até o esgotamento do óleo na amostra botânica. O solvente foi retirado em um evaporador rotativo sob pressão reduzida. O óleo teve sua densidade aparente estimada (0,914 g/mL), e em seguida conservado sob refrigeração (-4 °C) e seu volume foi dividido em pequenas alíquotas,



para uso nos procedimentos experimentais. Quando necessário, as amostras foram suspensas em água destilada.

Toxicidade Aguda

O óleo de neem foi administrado em doses crescentes por via oral (0,625, 1,25, 2,5 e 5,0 g/kg) em ratos de ambos os sexos ($n = 6$ /dose) privados de ração por 12 horas. O grupo controle recebeu água destilada. Após a administração, os animais foram observados atentamente por 3 h, numa superfície plana e cercada, e em seguida foram transferidos para suas respectivas gaiolas e observados durante intervalos regulares. Efeitos tais como movimentos estereotipados, deambulação, depressão ou estimulação do sistema nervoso central, tremor e ereção da cauda, analgesia, diarreia, piloereção, coma e morte foram observados e anotados segundo a tabela de Malone (1977). A mortalidade em cada grupo foi observada por até 14 dias e o valor da dose letal média (DL50) estimado, segundo o método de Miller e Tainter (1944).

Administração do óleo de Neem na fase de pré-implantação da gestação

Após a confirmação da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal por microscopia óptica, três grupos de ratas prenhas ($n = 5-9$ /grupo) foram tratados diariamente por via oral, respectivamente com óleo de neem (1,0 e 2,0 g/kg) e água destilada (controle) durante a fase I ou de pré-implantação correspondendo do 1° ao 6° dia de gestação (ALMEIDA; MELO; XAVIER, 2000). Durante a prenhez, as ratas foram observadas quanto aos sinais de toxicidade. O ganho de massa materno foi determinado durante o período total de gestação e no período de tratamento. No 20° dia de prenhez, as ratas foram submetidas à eutanásia por inalação excessiva de éter e em seguida procedeu-se a laparotomia para retirada dos cornos uterinos e determinação das variáveis número de fetos vivos e mortos, relação feto/mãe, massa dos fetos, das placentas e dos ovários, número de implantação e reabsorção, número de corpos lúteos, perda de pré-implantação (número de corpos lúteos - número de implantações viáveis / número de corpos lúteos $\times 100$) perda de pós-implantação (número de implantações - número de fetos vivos / número de implantações $\times 100$) e observada a presença ou não, de malformação fetal.

Análise estatística

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (epm) ou mediana. As diferenças entre os grupos foram analisadas, através da Análise de Variância, seguido por Newman-Keuls ou Qui-quadrado. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi sempre a 5%.

Resultados e discussão

Toxicidade Aguda

O óleo de neem, quando administrado por via oral nas doses de 0,625 a 5,0 g/kg, não produziu morte em ratos de ambos os sexos, por um período de até 14 dias de observação; fato esse que impossibilitou a estimativa da dose letal média. Durante o período não se observaram sinais externos de toxicidade. Esses resultados sugerem, em princípio, uma baixa toxicidade do óleo de neem por via oral.

Administração do óleo de Neem na fase de pré-implantação da gestação

Durante o período de tratamento (1° ao 6° dia) e no período de gestação (1° ao 20° dia) não se registraram mortes e não se observaram sinais clínicos visíveis de toxicidade materna como perda de peso, redução do consumo de ração, piloereção, diarreia, alteração da atividade locomotora e sangramento vaginal. Um dos principais indicadores de toxicidade materna é a perda de massa corporal. Os resultados da Tabela 1 mostram que não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados e controle, no aumento de massa corporal na fase de pré-implantação e na gestação total, o que sugere ausência de toxicidade materna. Após laparotomia, não se constatou entre os grupos tratados e controle a presença de natimortos, assim como, ao exame macroscópico externo nenhuma malformação foi detectada, indicando ausência de efeitos teratogênicos. A Tabela 1 mostra que o tratamento com óleo de neem não alterou de forma estatisticamente significativa as variáveis reprodutivas analisadas quando comparadas ao grupo controle, exceto a massa dos fetos que foram reduzidas em 10,9 e 12,1% respectivamente para as doses de 1,0 e 2,0 g/kg. Esses resultados indicam que o óleo de neem não interfere com a fase de pré-implantação. Nesse período, o embrião se encontra com células indiferenciadas em divisão mitótica. A redução do número





Tabela 1: Efeito do óleo de sementes de Neem (ON, 1,0 e 2,0 g/kg), administrados por via oral sobre variáveis reprodutivas, obtidas após o tratamento na fase embriogênica (1º ao 6º dia) da prenhez.

VARIÁVEIS REPRODUTIVAS	CONTROLE	ON (1,0g/kg)	ON (2,0g/kg)
Fêmeas prenhas	9	5	8
Ganho de massa período de gestação (g) ¹	99,0 ± 7,6	93,1 ± 4,4	85,8 ± 2,9
Ganho de massa período de implantação (g) ¹	15,5 ± 1,2	12,3 ± 3,8	11,7 ± 2,2
Número de fetos vivos	105	52	86
Número de fetos mortos	0	0	0
Relação feto/mãe ¹	11,7 ± 0,7	10,4 ± 0,9	10,6 ± 0,7
Massa dos fetos (g) ¹	4,23 ± 0,11	3,77 ± 0,21*	3,72 ± 0,11*
Massa das placentas (g) ¹	0,420 ± 0,006	0,432 ± 0,009	0,449 ± 0,007
Massa dos ovários (mg/100g) ¹	13,4 ± 0,8	15,3 ± 0,5	15,3 ± 1,0
Número de implantações	109	52	90
Número de reabsorções	4	0	4

¹Os valores representam a média ± epm.

²Os valores representam a mediana.

*Indica estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido de Newman-Keuls, p < 0,05).

de células no embrião durante essa fase pode induzir retardo na formação do blastocisto (KOLA; FOLB, 1986), aumento nas perdas de pré e pós-implantação (KVITKO; GIMMLER, 1986). A taxa de perda de pré-implantação é o principal parâmetro avaliado nesse período e como mostrado na Tabela 1 não houve diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos tratados. Segundo Almeida e Lemonica (2000), a taxa de perda de implantação estabelece a correlação entre o número de óvulos liberados e aqueles que, depois de fecundados, conseguiram sofrer implantação no útero. Da mesma forma, não se observou diferença estatística entre os grupos tratados e controle nos valores da massa dos ovários e do número de corpos lúteos, o que pode ser interpretado como um aumento normal do volume do corpo lúteo e como uma produção normal de progesterona (CHANG et al., 2002).

A redução significativa da massa dos fetos nos grupos tratados aponta para um possível efeito fetotóxico; por outro lado, uma explanação alternativa seria o fato do neem possuir atividade hipoglicemiante, o que levaria a redução dos níveis de glicose necessária

para o metabolismo fetal culminando dessa forma com uma redução da massa fetal. Baseado nos resultados obtidos, conclui-se que a administração do óleo de neem não induziu toxicidade materna e não produziu efeito anti-implantação, contudo a redução da massa corporal fetal pode indicar possível efeito fetotóxico.

Referências

- AHMED, N.U.; MOSTOFA, M.; AWAL, M.A. Comparative efficacy of modern anthelmintics with that of neem seeds against gastro-intestinal nematodiasis in sheep. *Bangladesh Veterinary Journal*, v.28, p.21-23, 1994.
- ALADAKATH, R.H.; AHAMED, R.N.; AHAMED, M.; GHOSE-SAWAR, M.G. Sperm parameters changes induced by Azadirachta indica in albino rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, v.12, p.69-76, 2001.
- ALAM, M.M.; SIDDIQUI, M.B.; HUSAIN, W. Treatment of diabetes through herbal drugs in rural India. *Fitoterapia*, v.61, p.240-242, 1990.
- ALMEIDA, E.R.; MELO, A.M.; XAVIER, H. Toxicological evaluation of the hydroalcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldine in rats. *Phytotherapie Research*, v.12, n.2, p.99-102, 2000.
- ALMEIDA, F.C.G.; LEMONICA, I.P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.73, p.53-60, 2000.
- ASCHER, K.R.S. Nonconventional insecticidal effects of pesticides



available from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Archives of insect Biochemistry and Physiology*, v.22, p.433-449, 1993.

7. ASIATICO, J.M.; ZOEIBISCH, T.G. Control de mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) en tomate com insecticidas de origen biológico y químico. *Manejo Integrado de Plagas*, v.24/25, p.1-7, 1992.

8. BALASENTHIL, S.; ARIVAZHAGAN, S.; RAMACHANDRAN, C.R.; RAMACHANDRAN, V.; NAGINI, S. Chemopreventive potential of neem (*Azadirachta indica*) on 7,12 - dimethylbenz[] anthracene (DMBA) induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Journal of Ethnopharmacology*, v.67, p.189-195, 1999.

9. BOEKE, S.J.; BOERSMA, M.G.; ALINK, G.M.; VAN LOON, J.J.; VAN HUIS, A.; DICKE, M.; RIETJENS, I.M.C.M. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. *Journal of Ethnopharmacology*, v.94, p.25-41, 2004.

10. CHANG, C.V.; FELÍCIO, A.C.; REIS, J.E.P.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M. Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.81, p.265-269, 2002.

11. CHATTOPADHYAY, R.R. Possible mechanism of antihyperglycemic effect of *Azadirachta indica* leaf extract. Part IV. *General Pharmacology*, v.27, p.367-372, 1996.

12. CHINNASAMY, N.; HARISHANKAR, N.; KUMAR, P.U.; RUKMINI, C. Toxicological studies on debitterized neem oil (*Azadirachta indica*). *Food and Chemical Toxicology*, v.31, p.297-301, 1993.

13. COUDRIET, D.T.; PRABHAKER, N.; MEYERDIRK, D.E. Sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae). Effects of neem-seed extract on oviposition and immature stages. *Environmental Entomology*, v.14, p.776-779, 1985.

14. CUBILLO, D.; QUIJIJE, R.; LARRIVA, W.; CHACÓN, A.; HILDE, L. Evaluación de la repelencia de varias substancias sobre la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Manejo Integrado de Plagas*, v.33, p.26-28, 1994.

15. DASGUPTA, T.; BANERJEE, S.; YADAVA, P.K.; RAO, A.R. Chemopreventive potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems. *Journal of Ethnopharmacology*, v.92, p.23-36, 2004.

16. DHAR, R.; ZHANG, K.; TALWAR G.P.; GARG, S.; KUMAR, N. Inhibition of the growth and development of asexual and sexual stages of drug-sensitive and resistant strains of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* by Neem (*Azadirachta indica*) fractions. *Journal of Ethnopharmacology*, v.61, p.31-39, 1998.

17. DHALIWAL, P.K.; ROOP, J.K.; GURAYA, S.S.; DHAWAN, A.K. Antifertility activity of neem-seed oil in cyclic female rats. In: Dhaliwal, G.S., Arora, R., Randhawa, N.S. (Eds.), *Ecological Agriculture and Sustainable Development*, v.2, Proceedings of the International Conference on Ecological Agriculture: Towards Sustainable Development, Chadigard, India, p.340-346, 1998.

18. GARG, G.P.; NIGAM, S.K.; OGLE, C.W. The gastric antiulcer effects of the leaves of the neem tree. *Planta Medica*, v.59, p.215-217, 1993.

19. GARG, S.; TALWAR, G.P.; UPADHYAY, S.N. Immunocontraceptive activity guided fractionation and characterization of active constituents of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v.60, p.235-246, 1998.

20. GÓMEZ, P.; CUBILLO, D.; MORA, G.A.; HILJE, L. Evaluación de posibles, repelentes de *Bemisia tabaci*: I. Productos comerciales. *Manejo Integrado de Plagas*, v.46, p.9-16, 1997.

21. KAHN, P.K.; AWASTHY, K.S. Cytogenetic toxicity of neem. *Food and Chemical Toxicology*, v.41, p.1325-1328, 2003.

22. KASTURI, M.; MANIVANNAN, B.; AHAMED, R.N.; PARVEEN, D.S.; PATHAN, K.M. Changes in epididymal structure and function of albino rat treated with *Azadirachta indica* leaves. *Indian Journal of Experimental Biology*, v.33, p.725-729, 1995.

23. KASTURI, M.; AHAMED, R.N.; PATHAN, K.M.; PARVEEN, D.S.; MANIVANNAN, B. Effects of *Azadirachta indica* leaves on the seminal vesicles and ventral prostate in albino rats. *Indian Journal of Physio-*

logy and Pharmacology, v.41, p.234-260, 1997.

24. KILLARE, B.; SHRIVASTAV, T.G. Spermicidal activity os *Azadirachta indica* (neem) leaf extract. *Contraception*, v.68, p.225-229, 2003.

25. KOLA, I.; FOLB, P. Chlorpromazine inhibits the mitotic index, cell number, and the formation of blastocyst, and delays implantation of CBA mouse embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.76, p.527-36, 1986.

26. KVITKO, K.; GIMMLER, M.C. Effects of intergerrimine on the implantation and intrauterine development of mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.29, p.223-7, 1986.

27. LAL, R.; GANDHI, M.; SANKARANARAYANAN, A.; MATHUR, V.S.; SHARMA, P.L. Antifertility effect of *Azadirachta indica* oil administered per os to female albino rats on selected days of pregnancy. *Fitoterapia*, v.58, n.4, p.239-242, 1987.

28. MALONE, R.A. Pharmacological aproache to natural products screening and avaliation. In: *New natural products and plant drugs With Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*. Verlag, Berlin: Springer, p.24-53, 1977.

29. MILLER, L.C.; TAINTER, M.L. Estimation of the ED50 and error by means of logarithmic probit graph paper. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.57, p.261-264, 1944.

30. MUKHERJEE, S.; TALWAR, G.P. Termination of pregnancy in rodents by oral administration of Praneem, a purified neem seed extract. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.35, p.51-56, 1996.

31. MUKHERJEE, S.; LOHIYA, N.K.; PAL, R.; SHARMA, M.G.; TALWAR, G.P. Purified Neem (*Azadirachta indica*) seed extracts (Praneem) abrogate pregnancy in primates. *Contraception*, v.53, p.375-378, 1996.

32. NARDO, E.A.B. de; COSTA, A.S.; LOURENÇÃO, A.L. Melia azedarach extract as na antifeedant to *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Florida Entomologist*, v.80, p.92-94, 1997.

33. OBASEKI, O.; JEGEDE FANDUNSIN, H.A. The antimalarial activity of *Azadirachta indica*. *Fitoterapia*, v.57, p.247-251, 1986.

34. PAI, M.R.; ACHARYA, L.D.; UDUPA, N. Evaluation of antiplaque activity of *Azadirachta indica* leaf extract gel - a 6-week clinical study. *Journal of Ethnopharmacology*, v.90, p.99-103, 2004.

35. PARVEEN, D.S.; MANIVANNAN, B.; PATHAN, K.M.; KASTURI, M.; AHAMED, R.N. Antispermatic activity of *Azadirachta indica* leaves in albino rats. *Current Science*, v.64, p.688-689, 1993.

36. RAJI, Y.; OGUNWANDE, I.A.; OSADEBE, C.A.; JOHN, G. Effects of *Azadirachta indica* extract on gastric ulceration and acid secretion in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v.90, p.167-170, 2004.

37. SCHMUTTERER, H. Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology*, v.35, p.271-297, 1990.

38. SRIVASTAVA, M.K.; RAIZADA, R.B. Aassessment of embryo/feto-toxicity and teratogenicity of azadirachtin in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v.39, p.1023-1027, 2001.

39. XUAN, T.D.; EIJI, T.; HIROYUKI, T.; MITSUHIRO, M.; KHANH, T.D.; CHUNG, I.M. Evaluation on phytotoxicity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) to crops and weeds. *Crop protection*, v.23, p.335-345, 2004.

