

POTENCIAL TÓXICO DE ÓLEOS DE SEMENTES DE *Azadirachta indica* OBTIDOS ATRAVÉS DE EXTRAÇÃO POR MACERAÇÃO E POR SOXHLET¹

TOXIC POTENTIAL OF *Azadirachta indica* SEED OILS OBTAINED THROUGH MACERATION AND SOXHLET EXTRACTION

Ulisses Mariano Torres², Isadora Pereira da Silva Barreto³,
Jair Marques Junior⁴ e Claudemir Batalini⁵

RESUMO

Azadirachta indica A. Juss (nim) é uma planta nativa do continente Indiano, alvo de estudos devido seu potencial praguicida e repelente. A utilização de plantas é uma alternativa ao uso de inseticidas sintéticos, que podem trazer malefícios a alguns indivíduos e ao meio ambiente, bem como a busca por solventes menos tóxicos. O óleo extraído das sementes de *A. indica* possui o bioativo azadiractina, responsável pela ação inseticida. Este trabalho objetivou avaliar o perfil de toxicidade em ensaios com larvas de *Artemia salina* de óleos obtidos de sementes de *A. indica* por dois métodos extrativos diferentes, usando etanol comercial (93%) como solvente: maceração e soxhlet. Os testes de letalidade com *A. salina* foram realizados em triplicata. Os rendimentos percentuais alcançados no processo de extração do óleo por maceração e por soxhlet foram, respectivamente, 39,0 % e 28,0 %. O perfil de toxicidade apresentou baixo grau de toxicidade, com pequena variação dentre os métodos, indicando um potencial promissor na utilização desses óleos para diversas aplicações.

Palavras-chave: azadiractina; nim; toxicidade; inseticida.

ABSTRACT

Azadirachta indica A. Juss (neem) is a plant native to the Indian continent and has been studied for its pesticide and repellent potential. The use of plants offers an alternative to the use of synthetic insecticides, which can be harmful to some individuals and the environment, as well as the search for less toxic solvents. The oil extracted from *A. indica* seeds contains the bioactive azadirachtin, responsible for its insecticidal action. The objective of this study was to evaluate the toxicity profile of oils obtained from *A. indica* seeds using two different extraction methods, using commercial ethanol (93%) as the solvent: maceration and soxhlet. Lethality tests with *A. salina* were performed in triplicate. The percentage yields achieved in the oil extraction process by maceration and soxhlet were, respectively, 39.0 % and 28.0 %. The toxicity profile showed a low degree of toxicity, with little variation between the methods, indicating a promising potential in the use of these oils for various applications.

Keywords: azadirachtin; neem; toxicity; insecticide.

1 Trabalho de Conclusão de Curso.

2 Bacharelado em Farmácia - Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT/CUA. E-mail: ulisses_8@hotmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-1192-0915>

3 Bacharelado em Farmácia - Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT/CUA. Mestranda em Ciências de Materiais - PPGMAT/UFMT. E-mail: isadorabfarma@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-6066-2837>

4 Mestre em Ciências de Materiais - Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT/CUA. E-mail: jairmarquesjunior@yahoo.com.br. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0949-1139>

5 Professor doutor (orientador) - Curso de Química Licenciatura - Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT/CUA. E-mail: pirapotimao@gmail.com. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5915-0850>

INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas tem se expandindo nas últimas décadas, tendo como objetivo a erradicação ou o controle de pragas no setor agrícola e no setor que envolve a saúde pública (Kamaraj *et al.*, 2024). Os métodos de controle de pragas sido empregados há muitos anos pelo uso de pesticidas sintéticos, o que levanta preocupações ecológicas e ambientais. Desta maneira, visando alcançar princípios sustentáveis, estratégias que envolvam o desenvolvimento de pesticidas a partir de fontes naturais vem ganhando destaque (Barbhuiya *et al.*, 2024).

O fato da contribuição de influência ecológica negativa dos pesticidas químicos contribui para a promoção de biopesticidas mais seguros e alternativos (Ayilara *et al.*, 2023). O potencial repelente e inseticida, ecologicamente correto, foi investigado em milhares de plantas, há cerca de 50 anos, em diferentes porções de diversas espécies vegetais (Kamaraj *et al.*, 2024). As vantagens de pesticidas naturais, em relação aos sintéticos, é a menor toxicidade e maior direcionamento a pragas específicas, visto que seus ativos exercem ação eficaz no sistema nervoso de insetos, mesmo em pequenas quantidades de material vegetal, devido a sua ampla variedade de metabólitos secundários (Kilani-Morakchi; Morakchi-Goudji; Sifi, 2021).

Desde os primórdios, inúmeras plantas são utilizadas para fins terapêuticos e muitas possuem atividade inseticida (Ghoshal & Sandal, 2024). Os óleos derivados de plantas são usados para proteção contra infestações de insetos, bactérias e fungos; são líquidos oleosos complexos e voláteis, relacionados a grupos funcionais como óxidos, fenóis, ésteres, cetonas, álcoois, aldeídos, sesquiterpenos, diterpenos e monoterpenos. Os compostos presentes são projetados para que seja um substituto viável aos pesticidas convencionais (Barbhuiya *et al.*, 2024).

A planta *Azadirachta indica* A. Juss, conhecida como “nim” ou “neem”, é uma das plantas prevalentes há mais de 2000 anos, cujas sementes possuem ação inseticida (Ghoshal & Sandal, 2024). O nim é nativo do continente Indiano e foi introduzido na América do Sul, sendo alvo de descobertas no combate a mais de 200 espécies de insetos e pragas (Fundaj, 2021). A planta tem sido explorada há décadas, e o seu óleo possui uma ampla gama de bioativos como a azaractina, salanina, nimbidina, gedunina, nimbina, isomargolona, margolona, nimbolide, margolona, entre outras, que conferem suas propriedades pesticidas e inseticidas, sendo o principal constituinte a azadiractina, que age como regulador de crescimento de insetos (Kilani-Morakchi; Morakchi-Goudji; Sifi, 2021; Barbhuiya *et al.*, 2024). Alguns estudos relacionam o potencial repelente do óleo de nim em artrópodes como *Anopheles arabiensis* e *Culex quinquefasciatus* (Mandal, 2011; Abiy *et al.*, 2015).

A bioatividade de espécies vegetais possui variações devido a diferença de habitat, ecologia e clima, o que resulta em alternâncias drásticas entre regiões. É fundamental, para o campo de pesquisa que utiliza fontes naturais, o controle de metabólitos secundários de plantas, a fim de garantir a disponibilidade de seus recursos vegetais e preservar a biodiversidade (Kamaraj *et al.*, 2024).

Então, a utilização de técnicas alinhadas à química verde é uma opção viável para a redução dos impactos ambientais e de saúde prejudicial, com a substituição de solventes tradicionais tóxicos e os custos associados ao descarte de resíduos perigosos, que são utilizados no processo de extração de óleos (Ghosha & Sandal, 2024; Kalisz *et al.*, 2024). Assim, além da questão ambiental, é necessário aprofundar estudos de toxicidade ao ser humano.

Os ensaios de toxicidade são capazes de prever propriedades essenciais para a sobrevivência, proliferação e funções celulares, por diferentes mecanismos. Ferramentas de bioensaios utilizando organismos vivos realizam medições sobre o efeito de fitofármacos em sistemas biológicos, por meio de estudos de “letalidade de larvas de *Artemia salina*”, na determinação da Dose Letal Média (DL_{50}) (Ávalos-Soto *et al.*, 2014). Apesar das limitações desses estudos, eles demonstraram correlações notáveis com ensaio de letalidade para camundongos, além de vantagens com a facilidade de uso, baixo custo, rapidez, capacidade de avaliar muitas amostras e benefícios éticos (Araya *et al.*, 2024). O teste com *Artemia salina* foi apresentado pela primeira vez por Meyer e colaboradores (Meyer *et al.*, 1982).

Considerando a importância do manejo de insetos, com base em questões ambientais, faz-se necessário mais avaliações em relação à descoberta de novos compostos. O impacto negativo de inseticidas sintéticos torna a produção de inseticidas derivados de plantas um caminho promissor. Para avaliar a eficácia e concentrações adequadas, esse trabalho tem como material de partida sementes de nim e teve como objetivo avaliar a toxicidade de óleos fixos obtidos por dois diferentes métodos extrativos, empregando etanol comercial como solvente, que apresenta-se como um solvente sintonizado com processos envolvendo a química verde.

METODOLOGIA

COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

Frutos de *A. indica* foram coletados de duas árvores lado a lado do município de Barra do Garças, estado de Mato Grosso, no mês de setembro do 2023, com coordenadas geográficas de 15°52'55.0"S 52°16'47.7"W. Do material coletado, as cascas foram retiradas para obtenção das sementes (Figuras 1 a 4).

Figura 1 - Árvore de *Azadirachta indica* (nim) utilizada na pesquisa.



Figura 2 - Árvore de *Azadirachta indica* (nim) utilizada na pesquisa, destacando os frutos.



Figura 3 - Frutos colhidos de *Azadirachta indica* (nim).



Figura 4 - Sementes de *Azadirachta indica* (nim) após retirada das cascas dos frutos.



Fonte: Construção do Autor.

EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS FIXOS

As sementes coletadas de *A. indica* foram submetidas a um período de 15 dias de secagem em temperatura ambiente, utilizando um dos balcões internos do LAPQUÍM/CUA/UFMT, sob proteção da luz. Após secagem, as sementes foram maceradas em almofariz e pistilo de porcelana e pesadas em balança analítica. A extração do óleo fixo foi realizada por dois métodos distintos, baseado nas literaturas: Oliveira *et al.* (2016) e Hidayat & Wulandari (2021): extração por solvente (maceração), em que utilizou-se temperatura ambiente e extração por aparelhagem de soxhlet, à quente; em ambas o solvente de extração foi etanol comercial 93%, adquirido de comércio local. Na obtenção do óleo por maceração, utilizou-se 200,0 g das sementes, que foram emergidas em 3,0 L de etanol 93 % por 20 dias, com agitação ocasional e temperatura ambiente. Para obtenção do óleo pelo método de soxhlet utilizou-se 130,0 g de sementes e etanol 93% como solvente, à quente, durante 4 horas. Posteriormente aos processos de extração, foi realizada a destilação simples, para a obtenção dos óleos, que foram mantidos em frascos de vidro próprios e armazenados em estufa

por 5 dias à 40 °C para secagem até peso constante. O cálculo de cada rendimento percentual foi realizado usando a equação a seguir:

$$\% \text{ Rendimento} = (\text{peso do óleo extraído} / \text{peso das sementes}) \times 100$$

ANÁLISE DO POTENCIAL TÓXICO

A avaliação do potencial tóxico do óleo obtido de sementes *Azadirachta indica* foi realizada utilizando larvas de *Artemia salina* Leach, para os diferentes métodos extrativos, seguindo a metodologia de Meyer *et al.* (1982), com adaptações baseada em Pour & Sasidharan (2011) e Batalini *et al.* (2020). Os ovos de *Artemia salina* Leach foram eclodidos em solução aquosa de sal marinho 0,037 g.mL⁻¹ (p/v), sob iluminação artificial constante (lâmpada de 40 W), à 28 °C ± 2 °C, por 48 horas. Foi preparada uma solução padrão de 5,0 mg.mL⁻¹ (250 mg de óleo e 50 mL de etanol). A partir da solução padrão, transferiu-se para tubos de ensaio, os volumes de 25,0 µL, 50,0 µL, 100,0 µL, 300,0 µL, 500,0 µL, 1.000,0 µL, 1500,0 µL, 2.000 µL e 3.000 µL, que posteriormente foram levados para evaporação do solvente em estufa à 50 °C. Após a completa secagem, acrescentou-se 3,0 mL de solução salina em cada tubo e 10 larvas vivas de *Artemia salina* Leach, completando o volume do tubo até 5,0 mL, obtendo ao final, as concentrações de 25,0 µg.mL⁻¹, 50,0 µg.mL⁻¹, 100,0 µg.mL⁻¹, 300,0 µg.mL⁻¹, 500,0 µg.mL⁻¹, 1000,0 µg.mL⁻¹, 1500,0 µg.mL⁻¹, 2000,0 µg.mL⁻¹, 2500,0 µg.mL⁻¹ e 3000,0 µg.mL⁻¹, respectivamente. Os tubos foram mantidos sob iluminação constante por lâmpada 40 W (28 °C ± 2 °C) por 24 horas. Após esse período, realizou-se a contagem das artemias vivas e mortas, com auxílio de uma lupa. A análise foi realizada em triplicata. A toxicidade foi classificada baseada em Nguta *et al.* (2011) e Costa *et al.* (2022), sendo considerada altamente tóxicas valores de CL₅₀ < 100,0 µg.mL⁻¹, moderadamente tóxicas CL₅₀ entre 100,0 µg.mL⁻¹ e 500,0 µg.mL⁻¹, fracamente tóxicas CL₅₀ entre 500,0 µg.mL⁻¹ e 1000,0 µg.mL⁻¹ e atóxicas para CL₅₀ > 1000,0 µg.mL⁻¹. O cálculo da Concentração Letal Média (CL₅₀) dos óleos foi realizada pelo método de Probit descrito por Finney (1971), utilizando o programa Starplus 2008 (Lhullier; Horta; Falkenberg, 2006).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS FIXOS

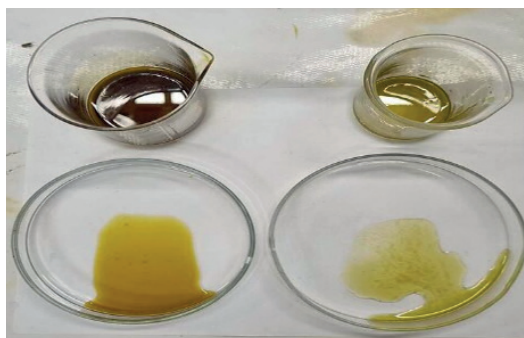
As sementes coletadas pesaram uma massa total de 484,0 g após maceradas e secas. O material vegetal foi dividido em 200,0 g para o método de extração por maceração e 130,0 g para a extração por soxhlet, sendo que 154,0 g foram acondicionadas para experimentos futuros ou possível necessidade de repetição da análise. Algumas características físico-químicas dos métodos extrativos e seus resultados são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características físicas, organolépticas e rendimento percentual dos óleos obtidos.

Método extrativo do óleo de <i>A. indica</i>	Temperatura	Cor	Odor	Massa (g)	Rendi-mento (%)
Maceração	Ambiente (25 °C)	Marrom amarelado	Característico	78,0	39,0
Soxhlet	78 °C	Verde amarelado	Característico	37,0	28,0

Fonte: Construção do Autor.

Os materiais extraídos resultaram na obtenção de líquidos oleosos de coloração marrom amarelado para o método de maceração e verde amarelado para o método envolvendo soxhlet (Figura 5). A diferença na tonalidade da extração pode estar relacionada ao método extrativo, onde temperaturas mais brandas num maior tempo, como foi o caso da maceração, podem resultar em maior concentração de metabólitos e rendimento do material.

Figura 5 - Óleos extraídos das sementes de *A. indica* por maceração (à esquerda) e por soxhlet (à direita).

Fonte: Construção do Autor.

Tonalidades semelhantes dos óleos obtidos por nosso grupo de pesquisa e destacados na Figura 5, extraídos de sementes de nim em diferentes partes do mundo podem ser encontrados em trabalhos na literatura, envolvendo extrações via maceração e soxhlet, em solventes como hexano, éter de petróleo, metanol e misturas de hexano-etanol (Tesfaye & Tefera, 2017; Aidoo *et al.*, 2021; Mustapha *et al.*, 2024). Nesta última referência, bem como em Barbosa *et al.* (2023), também encontram-se extrações do óleo via soxhlet usando o mesmo solvente empregado neste trabalho (etanol), gerando produtos oleosos com características visuais semelhantes.

A literatura apresenta um número muito maior de pesquisas envolvendo extrações de óleo de sementes de nim oriundos de diferentes países usando hexano como solvente, em diferentes técnicas. Com relação ao rendimento extrativo, observa-se que trabalhos que conduziram extrações do óleo em hexano, em extrações por maceração ou soxhlet, geraram rendimentos que variaram de 40,0 a 50,1 % (Tesfaye & Tefera, 2017; Aidoo *et al.*, 2021). Rendimentos na faixa de 50,0 % também foram alcançados em extrações soxhlet usando éter de petróleo (Mustapha *et al.*, 2024).

Com relação ao uso de etanol como solvente, verificam-se rendimentos entre 30,0 a 43,0 %, em extrações via soxhlet do óleo de sementes de nim (Tesfaye & Tefera, 2017; Barbosa *et al.*, 2023).

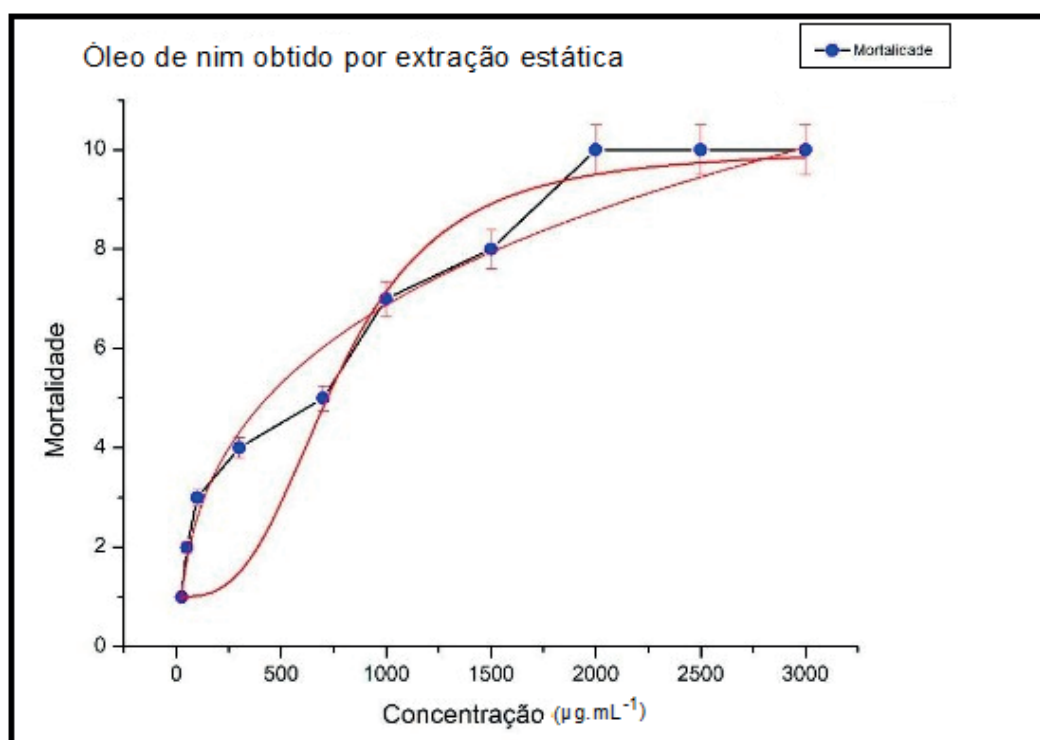
Numa comparação direta dos rendimentos obtidos por nosso grupo e apresentados na Tabela 1, verifica-se que os resultados encontram-se dentro do esperado.

A escolha do método de extração pode ser determinante para o incremento do rendimento no processo de obtenção de óleos de sementes da planta em estudo. Em via geral, metodologias que envolvam extrações com solventes tendem a resultar em rendimentos mais satisfatórios que os métodos de prensagem (Ernest *et al.*, 2022), apesar que este método, isento de solvente, sinaliza-se como alinhado aos princípios da química verde. Nesta mesma direção, o emprego nesta pesquisa do solvente etanol, mais seguro e econômico, realça a importância de se levantar processos mais sustentáveis, ecologicamente mais amigáveis.

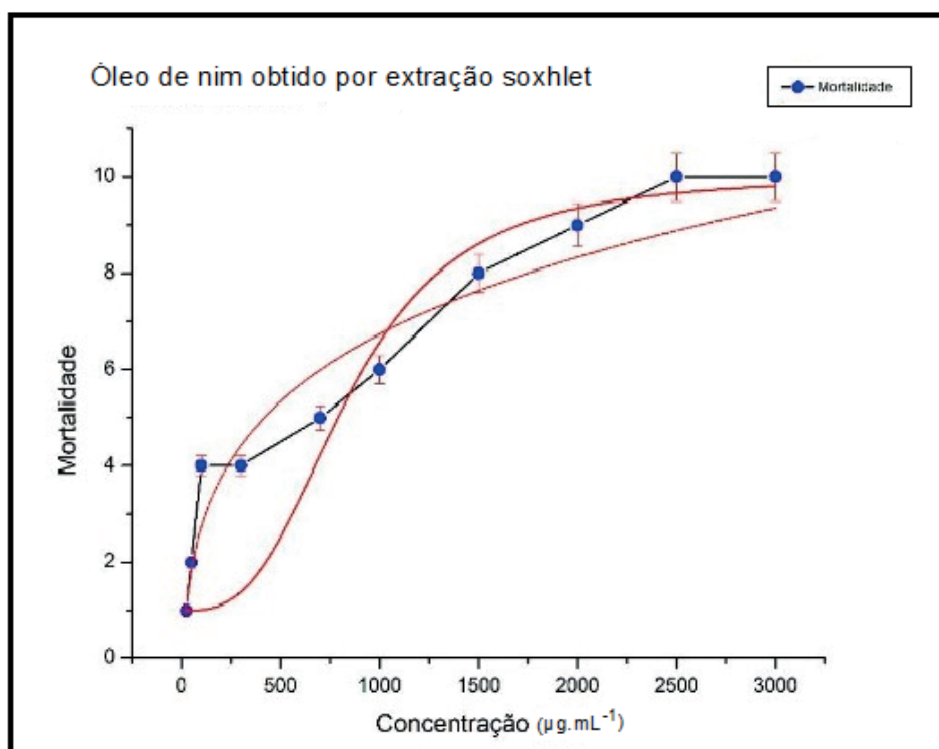
ANÁLISE DO POTENCIAL TÓXICO

Os resultados da Concentração Letal Média (CL_{50}) foram analisados para as diferentes concentrações de óleos obtidos das sementes de *A. indica* para os dois métodos extrativos, conforme as Figuras 6 e 7.

Figura 6 - Gráfico da Concentração Letal Média do óleo de *A. indica* extraído por



Fonte: Construção do Autor.

Figura 7 - Gráfico da Concentração Letal Média do óleo de *A. indica* extraído por soxhlet.

Fonte: Construção do Autor.

Os resultados revelaram uma Concentração Letal Média (CL_{50}) de $775,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a extração por maceração, enquanto para a extração por soxhlet o resultado foi de $850,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para a classificação do potencial tóxico, esses resultados foram comparados com valores da literatura, em trabalhos de Nguta *et al.* (2011) e Costa *et al.* (2022), em que classificam como extratos (ou substâncias) altamente tóxicas valores de $CL_{50} < 100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, moderadamente tóxicas com CL_{50} entre $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $500,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, fracamente tóxicas cujo CL_{50} entre $500,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1000,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e atóxicas para $CL_{50} > 1000,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, os óleos obtidos neste trabalho, pelas duas vias de extração, se encontram na faixa de fracamente tóxicas, com valores próximos obtidos pelas duas metodologias extrativas.

Levando em consideração as concentrações que apresentaram pequena diferença no número de mortes dos náuplios de *A. salina*, nos diferentes métodos extrativos, na concentração de $2000,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ obteve-se a maior mortalidade pelo método de maceração e na concentração de $100,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou maior mortalidade para a amostra obtida pelo método soxhlet, entretanto, o $n = 1$ não é significativo, visto o limite de confiabilidade de 95% do teste Probit de sua análise estatística.

Diferentes valores de CL_{50} são encontrados em trabalhos publicados envolvendo óleo de sementes de *A. indica*: Moraes *et al.* (2019) encontraram valor de $CL_{50} = 14,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (altamente tóxico segundo Nguta *et al.*, 2011 e Costa *et al.*, 2022), tendo como concentração máxima de tratamento de $70,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$, para óleo extraído de sementes com éter de petróleo via soxhlet. Já a pesquisa descrita por Ávalos-Soto *et al.* (2014) encontraram $CL_{50} = 476,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (moderadamente tóxico), com

concentração máxima de tratamento de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pelo método de extração por maceração, utilizando etanol como solvente.

Ao comparar diferentes porções do material vegetal de *A. indica*, Sousa *et al.* (2023) apresentaram resultados de $\text{CL}_{50} = 210,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o extrato etanólico das folhas e $476,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o óleo das sementes, ambos obtidos por maceração com etanol à temperatura ambiente, o que afirma que a utilização de métodos de extração com temperaturas brandas e solventes com afinidade, garante a conservação dos metabólitos em diferentes porções da planta, cujo padrão de potencial tóxico sinaliza possível ação repelente e inseticida/praguicida.

A baixa toxicidade obtida nas amostras de óleo obtidos de *A. indica* pelas duas metodologias neste trabalho cria expectativas para a fabricação de produtos com menor impacto ambiental. As aplicações desse material vegetal são amplas e multidisciplinares. É descrito pela Fundaj (2021) diversas aplicações, com a produção de sabões, esmaltes, lubrificantes e biopesticidas, por exemplo, ressaltando a variedade de produtos que podem ser formados a partir do óleo de nim, devido a sua maior qualidade e resistência à degradação, quando comparado a maioria dos óleos vegetais.

A utilização do óleo de *A. indica* para a formulação de produtos farmacêuticos com propriedades repelentes, como cremes, pomadas, loções, géis e pastas, são importantes para a prevenção de picadas de mosquitos transmissores de doenças, como observado por Aidoo *et al.* (2021). A aplicação de nanotecnologia tem grande potencial em conjunto com o nim e são alvos de estudo, mostrando-se eficientes na produção de produtos com surfactantes não iônicos. Os nanomateriais orgânicos desse tipo são econômicos, estáveis e biodegradáveis (Barbhuiya *et al.*, 2024). Portanto, os resultados dos estudos com a planta *A. indica*, até o momento, devem receber atenção nas áreas de ciências farmacêuticas e ciências de materiais.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, ao avaliar os dois diferentes métodos extrativos do óleo de *Azadirachta indica*, maceração e soxhlet, com o solvente etanol, revelou a possível extração em processos que se alinham à química verde, com rendimentos um pouco abaixo de alguns trabalhos da literatura, podendo ser melhorados. Ao analisar o grau de toxicidade, as duas amostras revelaram-se como fracamente tóxico para ambos os métodos. Entretanto, a variação na Concentração Letal Média indicou que a extração do óleo realizada por maceração tem maior toxicidade, em relação ao método à quente, via soxhlet, mas não foi significativo para interferir em suas respectivas classificações pelo teste com *Artemia salina* Leach. A sinalização do baixo potencial tóxico dos óleos estudados abre perspectivas para aplicações em áreas farmacêuticas e em ciências de materiais, com o desenvolvimento, por exemplo, de repelentes mais seguros e com menor impacto ambiental.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário do Araguaia - UFMT/CUA e ao Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais - LAPQUÍM (UFMT/CUA), pelo suporte científico para a realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ABIY, E.; GEBRE-MICHAEL, T.; BALKEW, M.; MEDHIN, G. Repellent efficacy of DEET, MyggA, Neem (*Azadirachta indica*) oil and chinaberry (*Melia azedarach*) oil against *Anopheles arabiensis*, the principal malaria vector in Ethiopia. **Malarial Journal**, n. 14, p. 187-193, 2015.
- AIDOO, O.; KUNTWORBE, N.; OWUSU, F. W. A.; KUEVI D. N. O. Chemical composition and in vitro evaluation of the mosquito (*Anopheles*) repellent property of neem (*Azadirachta indica*) seed oil. **Journal of Tropicam Medicine**, v. 2021, n. 1, 5567063, 2021.
- ARAYA, X.; OKUMU, M.; DURÁN, G.; GÓMEZ, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; LÉON, G. Assessment of the *Artemia salina* toxicity assay as a substitute of the mouse lethality assay in the determination of venom-induced toxicity and preclinical efficacy of antivenom. **Toxicon: X**, v. 22, 100195, 2024.
- ÁVALOS-SOTO, J.; TREVIÑO-NEÁVEZ, J. F.; VERDE-STAR, M. J.; RIVAS-MORALES, C.; ORANDAY-CÁRDENAS, A.; MORAN-MARTÍNEZ, J.; SERRANO-GALLARDO, L. B.; MORALES-RUBIO, M. E. Evaluación citotóxica de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica* (A. Juss) sobre diferentes líneas celulares. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, v. 45, n. 3, p. 39-44, 2014.
- AYILARA, M. S.; ADELEKE, B. S.; AKINOLA, S. A.; FAYOSE, C. A.; ADEYEMI, U. T.; GBADEGESIN, L. A.; OMOLE, R. K.; JOHNSON, R. M.; UTHMAN, Q. O.; BABALOLA, O. O. Corrigendum: Biopesticides as an alternative to synthetic pesticides: a case for nanopesticides, phytopesticides and microbial pesticides. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 1040901, 2023.
- BARBHUIYA, R. I.; WROBLEWSKI, C.; ELSAYED, A.; SUBRAMANIAN, J.; KAUR, G.; ROUTRAY, W.; SINGH, A. Development and physicochemical characterization of *Azadirachta indica* seed oil loaded niosomes nanoparticles: A potential natural pesticide. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 203, p. 197-206, 2024.

BARBOSA, L. M. P.; SANTOS, J. O.; DE SOUSA, R. C. M.; FURTADO, J. L. B.; VIDINHA, P.; GARCIA, M. A. S.; VITORINO, H. A.; DALL'OGGIO, D. F. Bioherbicide from *Azadirachta indica* seed waste: exploitation, efficient extraction of neem oil and allelopathic effect on *Senna occidentalis*. **Multidisciplinary Digital Publishing Institute**, v. 8, n. 3, p. 50-65, 2023.

BATALINI, C.; STOCCO, L. O.; FERNANDES, R. T. S.; JUNIOR, J. M. Avaliações fitoquímica, fitotóxica e antifúngica da entrecasca do caule de *Pterodon pubescens* Benth (sucupira branca). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 77589-77607, 2020.

COSTA, K. C. M.; SILVA, D. J. B.; JUNIOR, J. M.; BATALINI, C. Avaliação dos potenciais antioxidante e tóxico de amidas aromáticas sintetizadas seguindo a Química Verde. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, e5881125913, 2022.

ERNEST, D.; SORELLE, K. K.; YIMTA F.; ROGER, M. Evaluation of the repellent activity of *Azadirachta indica* oil (meliaceae) from Cameroon, and its preparations on *Anopheles gambiae*, *Culex quinquefasciatus* and *Aedes albopictus*. **Research Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 1-12, 2022.

FINNEY, D. J. **Probit analysis**. 3 ed. London: Cambridge University Press, 1971.

FUNDAJ. Nim (Neem) - *Azadirachta indica* A. Juss - A árvore das mil e uma utilidades. **Ministério da Educação**, 2021.

GHOSHAL, G.; SANDAL, S. Neem essential oil: Extraction, characterization, and encapsulation. **Food Chemistry Advances**, v. 4, 100702, 2024.

HIDAYAT, R.; WULANDARI, P. Methods of extraction: Maceration, percolation and decoction. **Eureka Herba Indonesia**, v. 2, n. 1, p. 73-79, 2021.

KALISZ, O.; TOBISZEWSKI, M.; NOWACZYK, A.; BOCIAN, S. Exploring the potential of green chemistry in reversed-phase liquid chromatography: A review of sustainable solvents. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 181, 118007, 2024.

KAMARAJ, C.; KUMAR, R. C. S.; AL-GHANIM, K. A.; NAVEENKUMAR, S.; PREM, P. Bio-active essential oils derived from medicinal plants and their insecticidal potential on houseflies and cockroaches. **South African Journal of Botany**, v. 171, p. 277-289, 2024.

KILANI-MORAKCHI, S.; MORAKCHI-GOUDJIL, H.; SIFI, K. Azadirachtin-based insecticide: overview, risk assessments, and future directions. **Frontiers in Agronomy**, v. 3, 676208, 2021.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006.

MANDAL, S. Repellent activity of eucalyptus and *Azadirachta indica* seed oil against the filarial mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) in India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 1, p. S109-S112, 2011.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, 31-34, 1982.

MORAES, R. P.; CORREA, I. C.; VANIN, A. B.; OLIVEIRA, D. L. Potencial tóxico dos óleos essenciais de endro (*Anethum graveolens*) e nim (*Azadirachta indica* a. Juss) frente *Artemia salina*. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 4, p. 3834-3838, 2019.

MUSTAPHA, S.; HABIB, M. U.; MA'ARUF, A. M.; MUSTAPHA, A.; SHEHU, H.; MADANIYYU, S. Y.; SANI, A. U.; INUWA, M. I. Sustainable technique for neem (*Azadirachta indica*) seed oil extraction: optimization and characterization. **African Journal of Environment and Natural Science Research**, v. 7, n. 2, p. 218-228, 2024.

NGUTA, J. M.; MBARIA, J. M.; GAKUYA, D. W.; GATHUMBI, P. K.; KABASA, J. D.; KIAMA, S. G. Biological screening of Kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 458-478, 2011.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C.S.; DUARTE, A.F.S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, supl. I, p. 230-239, 2016.

POUR, B. M.; SASIDHARAN, S. In vivo toxicity study of *Lantana camara*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 3, p. 230-232, 2011.

SOUSA, A. L. M.; PINHEIRO, R. R.; ARAUJO, J. F.; PEIXOTO, R. M.; DE AZEVEDO, D. A. A.; LIMA, A. M. C.; CANUTO, K. M.; RIBEIRO, P. R. V.; SOUZA, A. S. DE Q.; SOUZA, S. C. R.; DE AMORIM, S. L.; AMARAL, G. P.; DE SOUZA, V.; DE MORAIS, S. M.; ANDRIOLI, A.; TEIXEIRA, M. F. S. In vitro antiviral effect of ethanolic extracts from *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* against goat lentivirus in colostrum and milk. **Scientific Reports**, v. 13, n. 4677, p. 1-19, 2023.

TESFAYE, B.; TEFERA, T. Extraction of essential oil from neem seed by using soxhlet extraction methods. **International Journal of Advanced Engineering, Management and Science**, v. 3, n. 6, p. 646-650, 2017.