



Universidade
Estadual de Goiás

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE**

CARLOS EDUARDO LACERDA RAMALHO

**Avaliação da segurança materno-fetal, da mutagenicidade e do
efeito hipoglicemiante de extratos secos obtidos das folhas
de *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)**

**Anápolis - GO
2023**

Termo de Autorização para Publicação de Teses e Dissertações Eletrônicas (TDE) na Biblioteca Digital

Observações:

1 – O formulário está disponível pela Biblioteca Central

2 – Anexar no verso da capa

CARLOS EDUARDO LACERDA RAMALHO

Avaliação da segurança materno-fetal, da mutagenicidade e do efeito hipoglicemiante de extratos secos obtidos das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás.

Orientador: Dr(a) Joelma Abadia Marciano de Paula
Coorientador: Dr(a) Vanessa Cristiane S. Amaral

**Anápolis - GO
2023**

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UEG
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

RR165 RAMALHO, CARLOS EDUARDO LACERDA
a Avaliação da segurança materno-fetal, da
mutagenicidade e do efeito hipoglicemiante de extratos
secos obtidos das folhas de Azadirachta indica A. Juss
(Meliaceae) / CARLOS EDUARDO LACERDA RAMALHO;
orientador JOELMA ABADIA MARCIANO DE PAULA;
co-orientador VANESSA CRISTIANE DE SANTANA AMARAL. --
Anápolis, 2023.
121 p.

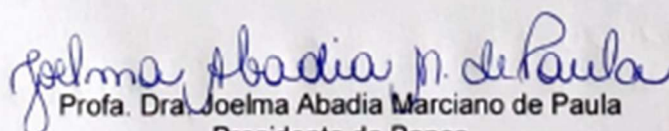
Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
Mestrado Acadêmico em Ciências Aplicadas a Produtos
para Saúde) -- Câmpus Central - Sede: Anápolis - CET,
Universidade Estadual de Goiás, 2023.

1. TOXICIDADE REPRODUTIVA. 2. ANOMALIAS CONGÊNITAS.
3. AZADIRACHTA INDICA. 4. SPRAY DRYING. I. PAULA,
JOELMA ABADIA MARCIANO DE, orient. II. AMARAL, VANESSA
CRISTIANE DE SANTANA, co-orient. III. Título.

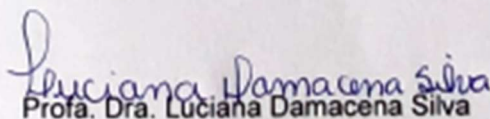
Carlos Eduardo Lacerda Ramalho

“Avaliação da segurança materno-fetal, da mutagenicidade e do efeito hipoglicemiante de extratos secos obtidos das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae)”

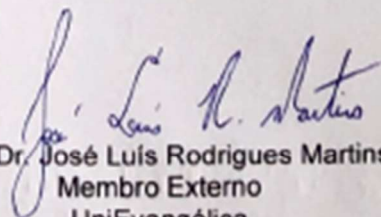
Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, para a obtenção do título de Mestre, aprovada em 01 de março de 2023, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores.



Prof. Dra. Joelma Abadia Marciano de Paula
Presidente da Banca
UEG



Prof. Dra. Luciana Damacena Silva
Membro Interno
UEG



Prof. Dr. José Luís Rodrigues Martins
Membro Externo
UniEvangélica

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, especialmente minha mãe e minha madrinha, por proverem acesso a educação, saúde, moradia e todo o suporte ao longo da vida para que aqui pudesse chegar.

Agradeço a minha namorada e companheira pela compreensão e paciência ante minha falta de paciência e muitas vezes ausência.

Aos professores orientadores e coorientadores Dr(a) Joelma Abadia M. de Paula, Dr(a) Vanessa Cristiane S. Amaral e Dr Walter Dias Junior dotados de imenso conhecimento, disposição e paciência. Sempre presentes e solícitos tornaram essa jornada uma oportunidade de aprendizagem constante.

As colegas Pabline Silva Gasparoti, Grazielle Alicia Batista Caixeta e Anielly Monteiro de Melo que compartilharam dos laboratórios, dividiram suas experiências e me ensinaram a como trabalhar no laboratório.

Aos alunos de iniciação científica Diego dos Santos Reis, Micaelle Cristina de Oliveira, Daniele Milany Fernandes Silva,

A todos aqueles que mesmo não estando aqui nominalmente descritos me auxiliaram nessa maratona.

A instituição Universidade Estadual de Goiás – UEG.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, que autorizou afastamento e custeou o meu salário para que eu pudesse me capacitar.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1 <i>Azadirachta indica</i> A. JUSS (MELIACEAE).....	19
2.2 Principais compostos bioativos relatados nas folhas de <i>Azadirachta indica</i>	20
2.2.1 Isoprenoides e não isoprenoides.....	21
2.3 Atividade atribuídas aos compostos presentes nas folhas de <i>Azadirachta indica</i>	23
2.3.1 Atividade antidiabética.....	23
2.3.2 Atividade anti-câncer.....	25
2.3.3 Atividade antioxidante.....	26
2.3.4 Atividade anti-inflamatória e antipirética.....	27
2.3.5 Atividade em distúrbios neurológicos.....	28
2.4 Obtenção de extrato seco por aspersão (<i>spray drying</i>).....	28
2.5 Estudos não-clínicos.....	29
2.5.1 Toxicidade aguda.....	30
2.5.2 Toxicidade reprodutiva.....	31
2.5.3 Teste de genotoxicidade.....	34
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 OBJETIVO GERAL.....	35
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4 MÉTODOS.....	36
4.1 Obtenção do extrato seco a partir das folhas de <i>Azadirachta indica</i>	36
4.1.1 Obtenção e caracterização do material vegetal.....	36
4.1.2 Obtenção do extrato líquido.....	36
4.1.3 Concentração e caracterização do extrato líquido.....	37
4.1.4 Obtenção e caracterização do extrato seco por aspersão (<i>spray drying</i>).....	37
4.1.4.1 Rendimento de secagem.....	39
4.1.4.2 Perda por dessecação.....	39
4.1.4.3 Atividade de água.....	39
4.1.4.4 Teor de flavonoides totais expressos como rutina.....	40
4.1.4.5 Perfil cromatográfico para compostos fenólicos.....	41
4.1.4.6 Teor de rutina.....	42
4.1.5 Validação do método analítico de doseamento da rutina por CLAE/DAD.....	43
4.2 Testes com animais.....	47
4.2.1 Aspectos éticos.....	47
4.3 Animais.....	48
4.4 Estudo de toxicidade reprodutiva.....	48
4.4.1 Acasalamento.....	48
4.4.2 Grupos experimentais e tratamento.....	49
4.4.3 Avaliação da toxicidade materna do extrato seco das folhas de <i>Azadirachta indica</i>	50
4.4.4 Avaliação dos parâmetros de desempenho reprodutivo materno.....	51

4.4.5 Massa dos órgãos e análise histopatológica.....	52
4.4.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos maternos.....	53
4.4.7 Morfologia externa e medidas morfométricas fetais.....	53
4.4.8 Análise esquelética dos fetos.....	53
4.4.9 Análise visceral dos fetos.....	54
4.5 Teste do micronúcleo (MN).....	54
4.6 Avaliação do efeito hipoglicemiante.....	55
4.6.1 Indução do estado diabético.....	55
4.6.2 Grupos experimentais e tratamento	56
4.6.3 Aferição da glicemia.....	57
4.7 Análise estatística.....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1 Extrato líquido concentrado.....	60
5.2 Obtenção e caracterização do extrato seco por aspersão (<i>spray drying</i>).....	60
5.3 Validação do método analítico para doseamento de rutina por CLAE-DAD.....	66
5.4 Estudo de toxicidade reprodutiva.....	75
5.4.1 Avaliação da toxicidade materna do extrato seco das folhas de <i>Azadirachta indica</i>	75
5.4.1.1 Avaliação de sinais clínicos de toxicidade	75
5.4.1.2 Avaliação do ganho de massa corporal, consumo de ração e água.....	76
5.4.1.3 Avaliação dos parâmetros de desempenho reprodutivo materno.....	78
5.4.1.4 Massa dos órgãos.....	79
5.4.1.5 Análise histopatológica.....	80
5.4.1.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos maternos.....	82
5.4.1.7 Morfologia externa e medidas morfométricas fetais.....	86
5.4.1.8 Análise esquelética.....	88
5.4.1.9 Análise visceral.....	93
5.5 Citotoxicidade e mutagenicidade pelo teste do micronúcleo.....	95
5.6 Ensaio para avaliar o efeito antidiabético.....	97
6 CONCLUSÃO.....	104
REFERÊNCIAS.....	105
ANEXOS.....	120
Anexo 1 – Parecer da Comissão de Ética no Uso em Animais (CEUA) da UEG, parecer n.002/2020	120

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Compostos identificados nas folhas de <i>Azadirachta indica</i> e seus efeitos conhecidos.....	22
Quadro 2 – País de origem dos extratos de <i>Azadirachta indica</i> utilizados nos estudos de efeito hipoglicemiante antidiabético.....	25
Tabela 1 – Diluições realizadas na solução mãe para obtenção dos 6 níveis concentrações da linearidade.....	44
Tabela 2 - Valores de Absorvância a 364 nm para as concentrações de 2,5 a 50 µg/mL.....	63
Tabela 3 - Absorvâncias a 364 nm das amostras em triplicata provenientes de diferentes secagens e os teores de flavonoides totais expressos como rutina.....	64
Tabela 4 - Parâmetros de adequabilidade do sistema (<i>system suitability</i>) em CLAE-DAD para a determinação de rutina nos extratos secos das folhas de <i>Azadirachta indica</i>	66
Tabela 5 – Repetibilidade das medidas de concentração, média, desvio padrão relativo (DPR) das seis repetições dos extratos secos microencapsulado (ESM) e não microencapsulado (ES), preparadas a 100% de rutina.....	72
Tabela 6 – Precisão intermediária das medidas de concentração, média, desvio padrão relativo (DPR) das seis repetições dos extratos secos microencapsulado (ESM) e não microencapsulado (ES), preparadas a 100% de rutina.....	73
Tabela 7 – Percentual de recuperação para os níveis de concentração baixo, média e alta no ensaio de exatidão pelo método de adição de SQR.....	73

Tabela 8 – Valores de concentração de rutina obtidos após pequenas e deliberadas alterações no método analítico.....75

Tabela 9 - Parâmetros de desempenho reprodutivo de ratas *Wistar* (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou com o extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação.....79

Tabela 10 – Massa (g) dos órgãos em valores absolutos de ratas *Wistar* (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou com o extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação.....80

Tabela 11 – Massa (g) relativa dos órgãos calculada como massa do órgão/(massa corporal x 0,001) de ratas *Wistar* (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou com o extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação.....80

Tabela 12 – Porcentagem de achados histológicos e alterações teciduais observadas nos tecidos cardíaco, hepático, pulmonar, renal e uterino de ratas *Wistar* (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou com o extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação.....82

Tabela 13 – Paramêtros bioquímicos de ratas *Wistar* (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou extrato seco de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante o período gestacional.....83

Tabela 14 - Medidas morfométricas (mm) de fetos de ratas *Wistar* (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou extrato seco de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante o período gestacional.....87

Tabela 15 – Alterações/malformações no esqueleto axial de fetos de ratas <i>Wistar</i> tratadas, via oral, com o veículo ou extrato seco de <i>Azadirachta indica</i> nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante o período gestacional.....	89
Tabela 16 – Alterações no esqueleto apendicular de fetos de ratas <i>Wistar</i> tratadas, via oral, durante a gestação com o veículo ou extrato seco de <i>Azadirachta indica</i> nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg.....	90
Tabela 17 – Alterações e malformações observadas nos cortes da cabeça de fetos de ratas <i>Wistar</i> tratadas durante a gestação, via oral, com o veículo ou extrato seco de <i>Azadirachta indica</i> nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg....	94
Tabela 18 – Alterações e malformações observadas nos fetos de ratas <i>Wistar</i> tratadas durante a gestação, via oral, com o veículo ou extrato seco de <i>Azadirachta indica</i> nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg.....	95
Tabela 19 - Avaliação da citogenotoxicidade do extrato seco de <i>Azadirachta indica</i> em ratas <i>Wistar</i> . Citotoxicidade da medula óssea expressa como relação entre eritrócitos policromático (PCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE). Genotoxicidade expressa pela frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) para cada 4000 PCEs.....	96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Azadirachta indica</i> A. Juss (Meliaceae). A – Árvores adultas no município de Santo Antônio de Goiás, Estado de Goiás, Brasil; B – Detalhes das folhas: pecíolos curtos, bordos lanceolados e serrilhados.....	20
Figura 2 – Estrutura química dos principais compostos identificados nas folhas de <i>Azadirachta indica</i>	23
Figura 3 – Desenho esquemático do procedimento seleção e acompanhamento dos animais até a inclusão no estudo.....	49
Figura 4 – Desenho esquemático dos procedimentos de acompanhamento dos animais durante o tratamento com controle e com extrato seco das folhas de <i>Azadirachta indica</i>	51
Figura 5 – Linha do tempo com as etapas da indução da glicemia em ratos Wistar machos e adultos.....	56
Figura 6 – Secagem por aspersão do extrato bruto concentrado com adição de adjuvantes. (A) <i>Spray Dryer</i> ; (B) Extrato seco obtido.....	60
Figura 7 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD do extrato seco de <i>Azadirachta indica</i> . A, 280 nm; B, 306 nm; C, 340 nm.....	61
Figura 8 - Cromatogramas obtidos em CLAE-DAD dos padrões de referência. A, 280 nm. B, 306 nm. C, 340 nm.....	61
Figura 9 - Espectros na região UV-Vis. A, rotina padrão; B, rotina no extrato seco de <i>Azadirachta indica</i> ; C, quercetina padrão; D, quercetina extrato seco <i>Azadirachta indica</i>	62
Figura 10 - Curva de calibração do padrão rutina com equação da reta.....	63
Figura 11 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD e espectros de absorção na região do UV. A, solvente utilizado nas amostras (metanol); B, substância química de referência (rutina); C, extrato seco microencapsulado de folhas de <i>Azadirachta indica</i> ; D, extrato seco de folhas de <i>Azadirachta indica</i>	67

Figura 12 – Curva de calibração do padrão rutina nas concentrações de 20, 30, 50, 100, 200 e 300 µg/mL para avaliação da linearidade do método.....	69
Figura 13 - Gráfico de dispersão dos resíduos da curva concentração x resposta da substância química de referência (rutina).....	70
Figura 14 - Diagrama de dispersão das curvas de calibração da substância química de referência (rutina) e do extrato adicionado de rutina.....	71
Figura 15 - Ganho de massa corporal (g) de ratas Wistar (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou extrato seco das folhas de <i>Azadirachta indica</i> nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação.....	76
Figura 16 - Média do consumo de ração (g) de ratas Wistar (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou extrato seco das folhas de <i>Azadirachta indica</i> nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação.....	77
Figura 17 - Média do consumo de água (mL) de ratas Wistar (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou extrato seco das folhas de <i>Azadirachta indica</i> nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação.....	78
Figura 18 – Cortes histológicos dos tecidos cardíaco, hepático, pulmonar, renal e uterino de ratas Wistar (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou com o extrato seco das folhas de <i>Azadirachta indica</i> nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação.....	81
Figura 19 - Fotos dos fetos recém-nascidos: (A) feto normal; (B) exencefalia; (C) macroglossia; (D) craniorraquisquise.....	87
Figura 20 – Presença de sítio de ossificação supranumerário nos ossos do esterno indicados pelas setas. Na figura (A) feto do grupo 1200 mg/kg; (B) feto do grupo 600 mg/kg.....	91
Figura 21 – Fenda palatina em feto de rata <i>Wistar</i> tratada, via oral, com a dose de 600 mg/kg de extrato seco das folha de <i>Azadirachta indica</i> . (A) Fenda palatina visualizada no corte transversal da boca; (B) Fenda palatina no corte frontal da cavidade nasal.....	93

Figura 22 – Valores da concentração plasmática da glicose (mg/dL) dos animais diabéticos (n=6/grupo) tratados, via oral, com 750 mg/kg de extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* (ES) e veículo/maltodextrina e aerosil® (veículo MA).....97

Figura 23 – Valores da concentração plasmática da glicose (mg/dL) dos animais (n=6/grupo) tratados, via oral, com 750 mg/kg de extrato seco microencapsulado das folhas de *Azadirachta indica* (ESM) e veículo/microcápsulas inertes (veículo MI).....98

Figura 24 – Ganho de massa corporal (n=6) dos grupos de animais diabéticos tratados, via oral, com o veículo microcápsulas inertes (veículo MI); com extrato microencapsulado das folhas de *Azadirachta indica* na dose de 750 mg/kg (ESM); veículo Aerosil® + maltodextrina (veículo MA) e com extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* na dose de 750 mg/kg (ES).....99

ABREVIATURAS

<i>A. indica</i>	<i>Azadirachta indica</i>
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C57BL/6	Camundongo isogênico
CAGR	<i>Compound Annual Growth Rate</i>
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
DL50	Dose Letal 50
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DMBA	Dimetilbenzantraceno
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidrazil
DPR	Desvio Padrão Relativo
DXP	1-desoxilulose 5-fosfato
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ES	Extrato Seco
ESM	Extrato Seco Microencapsulado
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GHS	<i>Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
GSH	Glutathiona
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
IPP	Isopentenil pirofosfato
MN	Micronúcleo

NCE	Eritrócitos Monocromáticos
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC-3	Célula de câncer de próstata
PCE	Eritrócitos Policromáticos
RDC	Resolução da diretoria colegiada
SOD	Superóxido dismutase
SQR	Substância Química de Referência
SUS	Sistema Único de Saúde
TTC	Terapias Tradicionais Complementares
UV-Vis	Ultravioleta - Visível

Azadirachta indica A. Juss. (Meliaceae) é popularmente utilizada em países asiáticos para o tratamento de enfermidades como malária, hanseníase, diabetes, úlceras, doenças de pele e outras. Ademais, as folhas desta espécie apresentam atividade anti-inflamatória, antifúngica, antioxidante, hipoglicemiante, antibacteriana e antitumoral. Embora as folhas de *A. indica* sejam muito utilizadas pela população e apresentem propriedades terapêuticas relevantes, a segurança do seu uso na gestação precisa ser melhor investigada. Diante disso, este estudo avaliou a segurança materno-fetal, a mutagenicidade e o efeito hipoglicemiante de extratos secos obtidos das folhas de *A. indica* em ratos *Wistar*. Para tanto, foi realizada a produção do extrato etanólico das folhas de *A. indica* seguida de sua secagem por aspersão (*spray drying*). Para caracterização do extrato, o teor de flavonoides totais, expressos como rutina, foi determinado por método espectrofotométrico e a rutina foi quantificada por cromatografia a líquido de alta eficiência. O teste de toxicidade materna e fetal foi realizado em ratas *Wistar* conforme as diretrizes do protocolo 421 da OECD, o teste do micronúcleo de acordo com protocolo OECD 474 e o efeito hipoglicemiante foi avaliado em ratos *Wistar*. Na avaliação da toxicidade materna e fetal, 40 ratas *Wistar* prenhes (n=10/grupo) foram tratadas por 21 dias com o veículo ou extrato seco das folhas de *A. indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg. Foram avaliados os parâmetros de desempenho reprodutivo, consumo de água, ração, ganho de massa corporal, parâmetros bioquímicos, histopatologia e massa dos órgãos. O teste do micronúcleo foi realizado em células da medula óssea dessas ratas para verificar a incidência de eritrócitos imaturos micronucleados. Para avaliação do efeito hipoglicemiante foram utilizados 24 ratos diabéticos (n=6/grupo) que receberam: (i) veículo (microcápsulas inertes); (ii) extrato microencapsulado de *A. indica* 750 mg/kg; (iii) veículo (adjuvantes) e (iv) extrato seco de *A. indica* 750 mg/kg. Quanto aos resultados, o teor de flavonoides totais do extrato seco, expressos como rutina, variou de 2,64 a 3,01%. O teor de rutina do extrato foi de 1,07%. No estudo de toxicidade reprodutiva e desenvolvimental não foram observados sinais comportamentais e clínicos de toxicidade nas fêmeas durante o período gestacional, nem em relação ao ganho de massa corporal, consumo de água e ração, parâmetros bioquímicos e de desempenho reprodutivo entre os grupos. Não foi verificada mutagenicidade nem carcinogenicidade no teste do micronúcleo. Os níveis glicêmicos dos animais não sofreram redução significativa durante o período de tratamento. Dessa forma, conclui-se que o extrato seco das folhas de *A. indica* não apresentou toxicidade materno-fetal quando administrado durante os 21 dias de gestação e não apresentou mutagenicidade ou carcinogenicidade. O extrato não apresentou efeito hipoglicemiante em ratos diabéticos.

Palavras-chave: Anomalias congênitas. Embriotoxicidade. Fetotoxicidade. Flavonoides totais. *Spray drying*. Teratogênese. Toxicidade reprodutiva.

Azadirachta indica A. Juss. (Meliaceae) is popularly used in Asian countries for the treatment of diseases such as malaria, leprosy, diabetes, ulcers, skin diseases and others.. In addition, the leaves of this species have anti-inflammatory, antifungal, antioxidant, hypoglycemic, antibacterial and antitumor activity. Although *A. indica* leaves are widely used by the population and have relevant therapeutic properties, the safety of their use in pregnancy needs to be better investigated. Therefore, this study evaluated the maternal-fetal safety, mutagenicity and hypoglycemic effect of dry extracts obtained from the leaves of *A. indica* in Wistar rats. For this purpose, the production of the ethanolic extract of the leaves of *A. indica* followed by its spray drying. For characterization of the extract, the content of total flavonoids, expressed as rutin, was determined by spectrophotometric method and rutin was quantified by high performance liquid chromatography. The maternal and fetal toxicity test was performed in female Wistar rats according to the guidelines of protocol 421 of the OECD, the micronucleus test according to protocol OECD 474 and the hypoglycemic effect was evaluated in male Wistar rats. In the evaluation of maternal and fetal toxicity, 40 pregnant Wistar rats (n=10/group) were treated for 21 days with vehicle or dry extract of *A. indica* leaves at doses of 300, 600 or 1200 mg/kg. Parameters of reproductive performance, water consumption, feed, body mass gain, biochemical parameters, histopathology and organ mass were evaluated. The micronucleus test was performed on cells of the bone media of these rats to verify the incidence of micronucleated immature erythrocytes. To evaluate the hypoglycemic effect, 24 diabetic rats (n=6/group) received: (i) vehicle (inert microcapsules); (ii) microencapsulated extract of *A. indica* 750 mg/kg; (iii) vehicle (adjuvants); (iv) dry extract of *A. indica* 750 mg/kg. As for the results, the total flavonoid content of the dry extract, expressed as rutin, ranged from 2.64 to 3.01%. The rutin content of the extract was 1.07%. In the study of reproductive and developmental toxicity, no behavioral and clinical signs of toxicity were observed in females during the gestational period, nor in relation to body mass gain, water consumption and feed, biochemical parameters and reproductive performance between groups. There was no mutagenicity or carcinogenicity in the micronucleus test. The glycemic levels of the animals did not suffer significant reduction during the treatment. Thus, it is concluded that the dry extract of *A. indica* leaves did not present maternal-fetal toxicity when administered during 21 days of pregnancy and did not present mutagenicity or carcinogenicity. The extract showed no hypoglycemic effect in diabetic rats.

Keywords: Embryotoxicity. Fetototoxicity. Total flavonoids. Spray Drying. Teratogenesis. Reproductive toxicity.

Em face ao potencial do mercado global de fitoterápicos emergem questões de ética em pesquisa, participação governamental, cultura dos povos, segurança e eficácia dos produtos. Nas duas últimas décadas, a Organização Mundial de Saúde (OMS), por meio de seus países membros, tem concentrado esforços no sentido de criar políticas e marcos regulatórios que garantam a segurança, qualidade e eficácia de plantas medicinais e fitoterápicos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999, 2019).

De acordo com o *WHO Global Report on Traditional and Complementary Medicine* (WHO, 2019), o Brasil, como um dos países membros da OMS, implantou uma política nacional e sistema de regulação para o setor, cujos esforços datam de 1988. No referido relatório a maioria dos países membros aponta que uma das maiores dificuldades enfrentadas na implantação das Terapias Tradicionais e Complementares (TTC) tem sido a falta de dados de pesquisas sobre eficácia, qualidade e segurança, bem como a falta de suporte financeiro para as pesquisas. Desde 1999 a atribuição de regular o mercado de produção de medicamentos alopáticos e fitoterápicos no Brasil está sob a responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 1999).

Os requisitos regulatórios específicos e gerais a serem atendidos pelos fabricantes de medicamentos fitoterápicos e insumos farmacêuticos ativos vegetais estão descritos nas Resoluções de Diretorias Colegiadas (RDC) da Anvisa (BRASIL, 2014, 2018, 2019a). Cabe aqui ressaltar que, nestas resoluções, medicamento fitoterápico é entendido como aquele “obtido com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade” (BRASIL, 2014).

A apresentação de comprovação da segurança e eficácia do produto é, portanto, requisito necessário ao registro. Exceto em casos específicos, esses dados devem ser obtidos por meio de ensaios não clínicos e clínicos (BRASIL, 2013, 2019b).

No cenário de plantas medicinais com potencial para gerar medicamentos fitoterápicos podemos destacar a *Azadirachta indica* A. Juss., popularmente conhecida como “neem”. Trata-se de uma planta pertencente à família Meliaceae, nativa da Índia e Myanmar, também encontrada em Bangladesh, Sri Lanka e outros países. É uma árvore tropical sempre verde, amplamente ramificada com folhas oblíquas e tronco robusto (PAUL; PRASAD; SAH, 2011). Oficialmente as primeiras plantas inseridas no Brasil foram provenientes de sementes originárias das Filipinas em 1986 e em 1989, com sementes da Índia, Nicarágua e República Dominicana, trazidas pela Fundação Instituto Agrônômico do Paraná (NEVES; CARPANEZZI, 2009). Devido ao potencial de uso da espécie, a partir do final da década de 1990 passou a ser cultivada em vários estados no Brasil (São Paulo, Minas Gerais, Pernambuco, Goiás, Bahia, Minas Gerais, Tocantins e Pará, entre outros) e se adaptou bem ao clima tropical brasileiro (NEVES, 2008). A plantação pode ser realizada a partir de sementes, mudas rebentos ou cultura de tecidos (NEVES; OLIVEIRA; NOGUEIRA, 2003).

Na medicina tradicional diversas partes de *A. indica* são utilizadas como, casca, raiz, flores, frutos, folhas e sementes. Essa planta é amplamente descrita na literatura pelos seus efeitos terapêuticos anti-inflamatório, antifúngico, hipoglicemiante, antibacteriano, antitumoral, entre outros (BHOWMIK *et al.*, 2010; SALEEM *et al.*, 2018).

Diante desse potencial terapêutico, os estudos de toxicidade com extratos das folhas de *A. indica* são fundamentais enquanto ferramentas para obtenção de informações que possam contribuir para seu uso com maior segurança. Tais ensaios são importantes para ajudar na determinação do risco potencial para mamíferos e, em última instância, de seres humanos (BRASIL, 2013).

Dentre os estudos de segurança destinados ao registro de medicamentos fitoterápicos está o ensaio de toxicidade reprodutiva em roedores, e a genotoxicidade. O efeito hipoglicemiante de extratos de *A. indica* são bastante descritos para plantas de origem asiática, contudo não há evidência desse efeito nas plantas cultivadas no Brasil. Nesse sentido, este estudo avaliou a segurança do uso do extrato etanólico seco das folhas de *A.*

indica durante a gestação e os seus efeitos sobre a prole. Adicionalmente, foi analisada a sua genotoxicidade e efeito hipoglicemiante.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Azadiractha indica* A. JUSS (MELIACEAE)

Comumente chamada de “neem”, *A. indica* é bastante conhecida na região sul da Índia há mais de 2000 anos, tendo recebido diversos nomes como, “árvore divina” e “farmácia da natureza” em razão do seu amplo espectro de atividades biológicas (PURI, 2006).

A. indica é uma árvore de copa densa que pode crescer até 30 m de altura e atingir 2,5 m de circunferência (Figura 1A). Quanto as folhas (Figura 1B) são do tipo compostas, imparipenadas, folíolos verde-escuros, aglomeradas nos extremos dos ramos simples e sem estípulas (NEVES; OLIVEIRA; NOGUEIRA, 2003). Suas raízes penetram profundamente no solo e estão adaptadas a sobreviver em regiões tropicais, subtropicais e áridas. Por tal versatilidade, *A. indica* pode ser encontrada em pelo menos 30 países em todos os continentes do mundo (BITTENCOURT, 2006; NATIONAL RESEARCH COUNCIL STAFF, 1992). Ainda quanto ao seu habitat, essa espécie pode se desenvolver em altitudes de até 1000 m e volumes de chuvas entre 400 a 1200 mm, permitindo encontrar árvores de neem desde regiões chuvosas até regiões secas e com solos de baixa qualidade (NATIONAL RESEARCH COUNCIL STAFF, 1992).

Embora a espécie *A. indica* não seja nativa do Brasil, pode ser cultivada em quase todas as regiões do país, sendo as condições climáticas das regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste propícias ao seu desenvolvimento (GUMIERO, 2008). Além de sua utilidade como planta medicinal e na agricultura como inseticida, também possui aplicação comercial na fabricação de carretas, ferramentas, móveis, assim como, é utilizada para o reflorestamento, recuperação de áreas degradadas por fornecer sombra e madeira resistente (VILELA, 2008).

Figura 1- *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae). A – Árvores adultas no município de Santo Antônio de Goiás, Estado de Goiás, Brasil; B – Detalhes das folhas: pecíolos curtos, bordos lanceolados e serrilhados.



Fonte: Soares (2020)

A planta *A. indica* é bastante utilizada na medicina tradicional indiana, e suas partes mais utilizadas com finalidade terapêutica são sementes, casca, folhas, frutos e flores. Dentre as doenças tratadas com o neem, na medicina popular, estão hanseníase, diabetes, úlceras, doenças de pele, constipação e outras (BHOWMIK *et al.*, 2010). A literatura *Ayurvedica* da Índia traz informações a respeito de aspectos como descrição, caracterização, identidade, pureza e constituintes do neem para casca da raiz, flores e frutos (BHOWMIK *et al.*, 2010).

2.2 Principais compostos bioativos relatados nas folhas de *Azadirachta indica*

Cada parte da planta possui uma combinação de compostos químicos expressos por meio dos seus metabolismos primário e secundário, os quais podem possuir atividade farmacológica, cosmética, inseticida dentre outras (KHARWAR *et al.*, 2020).

Os efeitos farmacológicos evidenciados em extratos de “neem” são resultado da ação de mais de 400 bioativos de grande diversidade estrutural produzidos através do metabolismo secundário da planta (KHARWAR *et al.*, 2020). Dentre as formas de atuação dessas substâncias estão: eliminação de radicais livres, desintoxicação, reparo do DNA, alteração do ciclo celular,

capacidade de modular vias de sinalização celular dentre outros (ARUMUGAM *et al.*, 2014; OMÓBÒWÁLÉ *et al.*, 2018; PATEL *et al.*, 2016).

Dada a imensa diversidade de compostos químicos identificados e com efeitos descritos para *A. indica*, os compostos químicos obtidos desta planta podem ser divididos em dois grandes grupos: isoprenoides e não isoprenoides (SUBAPRIYA; NAGINI, 2005).

2.2.1 Isoprenoides e não isoprenoides

Os compostos isoprenoides são formados pela ligação de unidades de isopreno, molécula constituída de 5 átomos de carbono em sua cadeia. Os terpenos podem ser classificados de acordo com o número de unidades de isopreno em monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos), triterpenos (30 carbonos). Os isoprenoides derivam, portanto, do isopentenil pirofosfato (IPP) ou do dimetilalil pirofosfato (DMAPP) os quais são formados por vias metabólicas distintas quais sejam: do mevalonato e do 1-desoxilulose 5-fosfato (DXP) (KITAOKA *et al.*, 2015; VRANOVÁ; COMAN; GRUISSEM, 2013).

Dentre os vários compostos isoprenoides presentes nas folhas de *A. indica* estão: diterpenoides, triterpenoides, vilasinin, limonoides e seus derivados (SUBAPRIYA; NAGINI, 2005).

Os compostos químicos não isoprenoides incluem proteínas, polissacarídeos, compostos sulfurosos, polifenóis (flavonoides e seus glicosídeos), dihidrochalconas, cumarinas, taninos e compostos alifáticos (SUBAPRIYA; NAGINI, 2005).

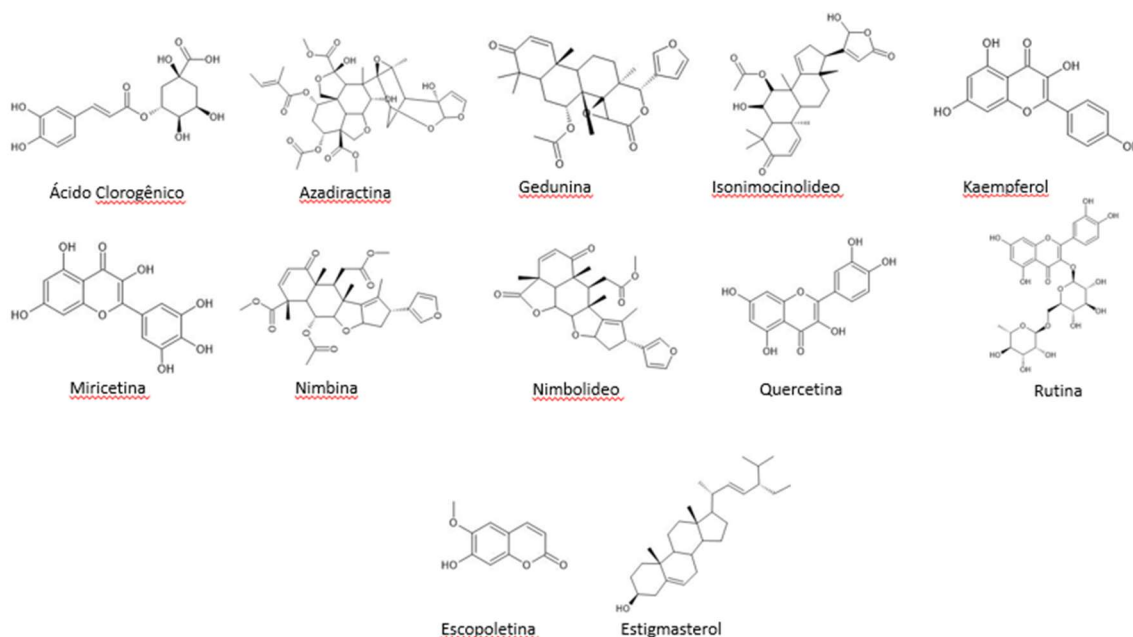
O Quadro 1 apresenta parte da gama de compostos bioativos já descritos nas folhas de *A. indica* e as suas atividades e na Figura 2 constam as estruturas químicas.

Quadro 1 – Compostos identificados nas folhas de *Azadirachta indica* e seus efeitos conhecidos

Composto	Atividade	Autor
Ácido Clorogênico	Antioxidante; anti-inflamatório	(LIU <i>et al.</i> , 2015); (HWANG <i>et al.</i> , 2014);
Azadiractina	Antioxidante; anti-inflamatório	(GHIMERAY <i>et al.</i> , 2009); (SOARES <i>et al.</i> , 2014);
Gedunina	Antimalárica	(KHALID; DUDDECK; GONZALEZ-SIERRA, 1989)
Isonimocinolideo	Citotóxico	(TAKAGI <i>et al.</i> , 2014a)
Kaempferol e derivados	Anticâncer; anti-inflamatório; antioxidante	(RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996); (KIM <i>et al.</i> , 2015); (LIU <i>et al.</i> , 2015);
Miricetina	Antioxidante; anti-inflamatório	(JUSTINO; VIEIRA, 2010); (DE OLIVEIRA AZEVEDO <i>et al.</i> , 2015);(CHO <i>et al.</i> , 2016);
<i>Neem Leaf Glicoprotein</i>	Anticâncer	(BOSE <i>et al.</i> , 2009)
Nimbina	Antioxidante; anti-inflamatório; antipirético	(GHIMERAY <i>et al.</i> , 2009); (NAIK <i>et al.</i> , 2014); (SCHUMACHER <i>et al.</i> , 2011)
Nimbolideo	Antimalárica; citotóxico; antioxidante	(KHALID; DUDDECK; GONZALEZ-SIERRA, 1989); (TAKAGI <i>et al.</i> , 2014b); (PRIYADARSINI <i>et al.</i> , 2010)
Quercetina	Anticancer; antioxidante; anti-inflamatório	(RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996); (JUSTINO; VIEIRA, 2010); (SIKDER <i>et al.</i> , 2014); (CHIRUMBOLO, 2010);
Rutina	Antioxidante; anti-hiperglicêmico	(SITHISARN; SUPABPHOL; GRITSANAPAN, 2006); (SUBAPRIYA <i>et al.</i> , 2003b); (NITURE; ANSARI; NAIK, 2014)
Escopoletina	Antioxidante	(MALIK <i>et al.</i> , 2011)
Estigmasterol	Antioxidante	(YOSHIDA; NIKI, 2003); (NAND; GUPTA; DRABU, 2012)

Fonte: Próprio autor

Figura 2. Estrutura química dos principais compostos identificados nas folhas de *Azadirachta indica*.



Fonte: Próprio autor

2.3 Atividades atribuídas aos compostos presentes nas folhas de *Azadirachta indica*

2.3.1 Atividade antidiabética

A atividade hipoglicemiante de diferentes partes de *A. indica* é bastante descrita na literatura científica, sendo o extrato bruto a forma mais utilizada (AKTER, 2013; ALZOHAIKY, 2016; GUPTA *et al.*, 2004; KHOSLA *et al.*, 2000; PATIL *et al.*, 2013). Na revisão realizada por Salem *et al.* (2018) foram relatados vários estudos *in vivo* e *in vitro*, incluindo experimentos com ratos (GUPTA *et al.*, 2004), coelhos (KHOSLA *et al.*, 2000) e células sanguíneas humanas (MARTÍNEZ *et al.*, 2014). Dentre os ensaios realizados em ratos, as partes vegetais utilizadas foram sementes, raiz, flor e folhas (SALEEM *et al.*, 2018). Dentre os extratos de folhas de *A. indica* o extrato clorofórmico se destaca como sendo o de maior efeito hipoglicemiante (YADAV *et al.*, 2016),

contudo, a utilização do clorofórmio como líquido extrator torna esse extrato menos atrativo para fins comerciais, devido aos impactos ambientais e toxicológicos.

Os flavonoides rutina e quercetina foram apontados como possíveis responsáveis pelo efeito hipoglicemiante de extratos das folhas de *A. indica* em ratos diabéticos induzidos por aloxana (NITURE; ANSARI; NAIK, 2014). O extrato clorofórmico de folhas de *A. Indica* apresentou resultados indicativos de capacidade de redução da glicemia em teste de tolerância a glicose. Os resultados indicam que o efeito se deve a capacidade de componentes do extrato de inibir atividade da glicosidase intestinal (BHAT *et al.*, 2011).

Por outro lado estudo realizado com o tetranortriterpenoide meliacinolin, isolado do extrato clorofórmico das folhas de *A. Indica*, demonstraram uma melhora dos parâmetros metabólicos dos camundongos tratados. Observou-se que o meliacinolin conseguiu diminuir a resistência a insulina, melhorar a função renal, diminuir o estresse oxidativo e melhorar o perfil lipídico. Tais efeitos indicam que os bioativos atuam em diferentes alvos responsáveis por desenvolver a patogênese da diabetes (GUTIERREZ; GUZMAN; GÓMEZ, 2011). O efeito hipoglicemiante de *A. indica* decorre da atuação de vários bioativos em diferentes sítios de ação. Dentre os efeitos propostos estaria o aumento da utilização da glicose periférica decorrente da inibição da ação da adrenalina no metabolismo da glicose (CHATTOPADHYAY, 1996).

Outra atividade demonstrada foi relacionada a recuperação da função pancreática por meio do aumento da secreção de insulina (AKINOLA *et al.*, 2010) (GHATULE *et al.*, 2012).

O efeito antidiabético foi avaliado também em um ensaio clínico randomizado no qual foram avaliadas três doses de extrato aquoso de neem obtidas de folhas e galhos. As preparações nas doses de 125, 250 e 500 mg duas vezes ao dia promoveram melhora nos níveis glicêmicos, redução da hemoglobina glicada, diminuição do stress oxidativo e redução da resistência a insulina em relação ao placebo (PINGALI *et al.*, 2020).

Ante a diversidade de autores que investigaram o efeito hipoglicemiante no Quadro 2 estão descritos o país de origem, o tipo de extrato utilizado, efeito observado e os autores. Nele constam também as pesquisas que não evidenciaram efeito hipoglicemiante com os extratos de *A. indica* oleoso

(DALLAQUA *et al.*, 2013) e aquoso (McCALLA *et al.*, 2015). A realização de estudos direcionados ao tratamento da diabetes é fundamental pois se trata de uma doença metabólica de alta prevalência e causadora de morbidades como cegueira, amputações e doença renal crônica (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2020). Nesse sentido, preparações a base de *A. indica* podem se tornar uma alternativa terapêutica em combinação com outros tratamentos, caso se mostrem efetivas e seguras.

Quadro 2 – País de origem dos extratos de *Azadirachta indica* utilizados nos estudos de efeito hipoglicemiante ou antidiabético

Origem da planta	Extrato utilizado	Autor
Índia	clorofórmico das folhas; etanólico 70% das folhas; éter de petróleo de sementes; óleo de neem; aquoso das folhas; alcoólico 70% da casca da raiz; aquoso das folhas;	(BHAT <i>et al.</i> , 2011); (CHATTOPADHYAY, 1999); (GUPTA <i>et al.</i> , 2004); (KHOSLA <i>et al.</i> , 2000); (NAGASHAYANA; JAGADEESH; REVANKAR, 2014); (PATIL <i>et al.</i> , 2013); (SATYANARAYANA <i>et al.</i> , 2015)
Nigéria	etanólico 70% das folhas; etanólico das folhas;	(AKINOLA <i>et al.</i> , 2010); (EKAIDEM <i>et al.</i> , 2007)
México	extração seriada em hexano, cloroformio e metanol	(GUTIERREZ; GUZMAN; GÓMEZ, 2011);
Jamaica	aquoso das folhas	(MCCALLA <i>et al.</i> , 2016)
Bangladesh	etanólico 90% das folhas; aquoso de folhas	(AKTER <i>et al.</i> , 2013) (AKTER, 2014)
Brasil	óleo de neem e etanólico da semente	(DALLAQUA <i>et al.</i> , 2013)

Fonte: Próprio autor

2.3.2 Atividade anti-câncer

A busca por bioativos capazes de atuar na prevenção e combate ao câncer se traduz em estudos destinados a compreender o efeito de extratos e produtos isolados na patogênese dessa enfermidade. O extrato etanólico das folhas de *A. indica* tem demonstrado atuar tanto *in vivo* como *in vitro* em diferentes tipos de tumores (DASGUPTA *et al.*, 2004; HAO *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2006; SUBAPRIYA *et al.*, 2003). Foi verificado efeito protetor do extrato etanólico de folhas de *A. indica* em camundongos com papilomas de pele e estômago, induzidos pelas substâncias 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) e benzopireno, respectivamente (DASGUPTA *et al.*, 2004).

O extrato das folhas de *A. indica* se mostrou capaz de reduzir o volume e o número de tumores mamários em ratas, induzidos pelo carcinógeno N-metil-N-nitrosureia. O efeito foi atribuído a alterações provocadas pelo extrato na indução da apoptose, inibição da angiogênese e alteração de genes ligados à multiplicação celular (ARUMUGAM *et al.*, 2014). Assim como observado em Dasgupta *et al.* (2004) o extrato etanólico das folhas de *A. indica* inibiu o desenvolvimento de carcinoma bucal induzido por DMBA em hamsters (SUBAPRIYA; KUMARAGURUPARAN; NAGINI, 2006). A atividade do extrato etanólico 80% das folhas de *A. indica* originária da Índia demonstrou capacidade de causar morte de células de câncer de próstata (PC-3), sendo a indução de apoptose o mecanismo apontado (KUMAR *et al.*, 2006). Dentre os compostos isolados do extrato etanólico das folhas de *A. indica* com atividade contra vários tipos de cânceres estão: nimbolide (células de carcinoma do colon, mama, próstata), gedunina (células de câncer de ovário), glicoproteína da folha de neem (Swiss e C57BL/6 camundongo), azadiractina (células de câncer cervical) (HAO *et al.*, 2014). O referido potencial terapêutico, seja como adjuvante na terapia ou como tratamento principal de neoplasias, ainda precisa ser confirmado em ensaios clínicos.

2.3.3 Atividade antioxidante

A oxidação de moléculas biológicas é uma das causas de processos inflamatórios e degenerativos. Esse estresse oxidativo é promovido pelos radicais livres ao interagir com macromoléculas dos seres vivos (ALZOHAIRY, 2016). A atividade antioxidante é apontada como responsável por retardar o dano no fígado e rins. O mecanismo envolvido seria decorrente do restabelecimento dos níveis normais da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e Glutathione (GSH) após o tratamento (BASIR; SHAILEY, 2012).

O aumento da atividade da glutathione, superóxido dismutase e catalase são fatores que demonstram o efeito antioxidante dos extratos etanólicos 70% e aquoso das folhas de *A. indica*. (BASIR; SHAILEY, 2012). O efeito antioxidante foi atribuído a presença de rutina e quercetina ao avaliar a

capacidade de diferentes extratos de folhas de *A. indica* originárias da Tailândia no ensaio de atividade antioxidante com 2,2-difenil-1-picrihidrazil (DPPH) (SITHISARN; SUPABPHOL; GRITSANAPAN, 2006).

A quantidade de polifenóis demonstrou ser fator mais importante no efeito antioxidante em testes realizados com folhas e casca de *A. indica* provenientes do Nepal (GUIMERAY *et al.*, 2009). Tanto os extratos da casca como das folhas apresentaram efeito antioxidante com DPPH e na eliminação de radicais hidroxila. No entanto, o efeito foi mais pronunciado com a casca que continha uma maior quantidade de compostos fenólicos que as folhas embora o conteúdo de flavonoides fosse maior nas folhas (GUIMERAY *et al.*, 2009).

Tais aspectos corroboram a existência de efeito potencialmente favorável a saúde dos extratos aquosos de *A. indica* amplamente utilizados na medicina tradicional.

2.3.4 Atividade anti-inflamatória e antipirética

A inflamação faz parte da fisiopatologia de várias doenças como câncer, diabetes e doenças cardiovasculares, assim como envolve uma série de mediadores químicos e células (YADAV *et al.*, 2016). Por essa razão substâncias capazes de interferir nos mecanismos que desencadeiam o processo inflamatório são úteis na terapêutica. Os limonoides são bioativos presentes em *A. indica* que demonstraram efeito anti-inflamatório através da inibição de mediadores pró inflamatórios (SCHUMACHER *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2014). Corroborando os estudos mencionados o extrato metanólico das folhas de *A. indica* originária do Nepal causaram substancial diminuição da inflamação celular; da concentração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio; inibição do fator de necrose tumoral e de interleucina 6 (LEE *et al.*, 2017).

2.3.5 Atividade em desordens neurológicas

As desordens neurológicas como as doenças de Alzheimer e Parkinson estão incluídas entre os potenciais alvos terapêuticos de metabólitos secundários já relatados em *A. indica* (GORANTLA *et al.*, 2019 ; HAN *et al.*, 2020 ; MAITI *et al.*, 2013 ; NIE *et al.*, 2015; OGUNLADE; ADELAKUN; AGIE, 2020; SANDHIR; KHURANA; SINGHAL, 2021; SUGANTHY *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2014). Os efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios da quercetina e do β -asarona promoveram melhora cognitiva dos ratos Alzheimer e Parkinson induzidos (HAN *et al.*, 2020; SRIRAKSA *et al.*, 2012). A quercetina em altas doses demonstrou ser capaz de melhorar a capacidade cognitiva de ratos com Parkinson induzidos por meio da sua ação antioxidante (SRIRAKSA *et al.*, 2012). Os limonoides nimbina e salanina extraídos de frutos de *A. indica* proveniente da Índia apresentaram capacidade de inibir a agregação da proteína Tau *in vitro*, sendo esse um dos alvos das pesquisas sobre a doença de Parkinson (GORANTLA *et al.*, 2019).

2.4 Obtenção de extrato seco por aspensão (*spray drying*)

A secagem é uma etapa fundamental na elaboração de diversos produtos, por exemplo, alimentos, medicamentos, cerâmicas e extratos vegetais (BROADHEAD; EDMOND ROUAN; RHODES, 1992; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; ZIAEE *et al.*, 2019).

A secagem por aspensão ou do inglês *spray drying* consiste na conversão de uma solução, suspensão ou emulsão em gotículas muito pequenas, promovendo um aumento expressivo da superfície de contato. Dessa forma, o calor fornecido ao sistema promove a secagem quase instantânea do material, decorrente da evaporação do solvente, restando assim as partículas sólidas (BROADHEAD; EDMOND ROUAN; RHODES, 1992; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; PERCY, 1872). Dentre as vantagens do processo de secagem por aspensão estão: processo contínuo e controlável; ampla possibilidade de modificações de parâmetros do processo para atingir finalidades específicas; aplicável tanto para compostos sensíveis

como resistentes ao calor; processo rápido e escalonável (ZIAEE *et al.*, 2019). No caso de extratos vegetais, a secagem por aspersão proporciona ainda maior estabilidade química, físico-química e microbiológica ante a menor quantidade de água remanescente no pó, assim como podem ser mais facilmente padronizados para utilização em preparações farmacêuticas (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Estudo realizado com extrato de *Jerusalem artichoke* (Asteraceae) para obtenção de inulina, utilizando secagem por *spray drying* e liofilização, demonstrou que o extrato obtido por *spray drying* apresentou melhor rendimento na secagem, menor umidade e menor tamanho de partícula em comparação com o mesmo obtido por liofilização (ZHU *et al.*, 2019). Entre as aplicações da tecnologia destaca-se a sua utilização na obtenção de extratos secos microencapsulados, como das folhas de *A. indica* (SOARES, 2020) e *Salvia miltiorrhiza* (SU *et al.*, 2008).

2.5 Estudos não clínicos

A finalidade dos estudos não clínicos é avaliar a segurança de uso de fármacos e fitoterápicos. No caso das drogas vegetais que possam vir a se tornar um produto tradicional fitoterápico ou um medicamento fitoterápico, são requeridas comprovações de segurança desses produtos. No Brasil, os requisitos exigidos para essas classes de produtos estão descritos na Resolução RDC nº 26/2014, sendo recomendado utilizar as orientações descritas no Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica (BRASIL, 2014).

Os testes de segurança recomendados para produto tradicional fitoterápico são: genotoxicidade e toxicidade reprodutiva (BRASIL, 2014). No caso de medicamento fitoterápico são recomendados testes de toxicidade aguda, dose repetida, tolerância local, genotoxicidade e toxicidade reprodutiva (BRASIL, 2014). A depender da situação pode ser recomendado estudo de carcinogenicidade e segurança farmacológica, sendo esse último apenas para medicamentos fitoterápicos. O teste de carcinogenicidade se faz necessário caso exista risco específico relacionado ao produto (BRASIL, 2014).

Existem vários estudos de toxicidade conduzidos com *A. indica* e eles diferem quanto ao tipo de extrato utilizado, as partes da planta usadas na produção do extrato, as vias de administração do extrato aos animais, as espécies de animais empregados, os protocolos experimentais adotados (ACHI *et al.*, 2018; BRAGA *et al.*, 2021; DORABABU *et al.*, 2006; GHATULE *et al.*, 2012). Serão abordados a seguir, os principais estudos que utilizaram preparações de *A. indica* administradas por via oral, posto que, a via parenteral não está incluída nos testes não clínicos para fitoterápicos. Os testes não clínicos avaliam a segurança de uso de fitoterápicos na apresentação a ser utilizada em humanos, excluindo dessa maneira a via parenteral (BRASIL, 2014).

2.5.1 Toxicidade aguda

O estudo de toxicidade aguda tem como finalidade estimar a dose letal média (DL₅₀) utilizando o menor número de animais (OECD, 2001). Um dos protocolos utilizados nesse estudo é o da *Organization for Economic Cooperation and Development* – (OECD) nº 423, que tem como finalidade o desenvolvimento de melhores práticas na condução de testes com produtos químicos com objetivo de permitir reprodutibilidade e padronização na avaliação e condução dos estudos (OECD, 2001).

De acordo com o referido protocolo, o estudo é conduzido com base em um fluxograma específico e levando-se em conta todas as informações disponíveis sobre o produto/bioativo a ser testado. Assim, são informações relevantes: a identidade da substância, estrutura química, propriedades físico-químicas, resultados de outros testes de toxicidade *in vitro/in vivo* e dados toxicológicos sobre substâncias estruturalmente relacionadas. Tais informações são essenciais para definir a importância do teste para aferição da segurança de uso em humanos, bem como para avaliar a dose mais adequada (OECD, 2001).

A toxicidade aguda de extratos aquoso e etanólico das folhas de *A. indica* foi realizada em camundongos (DORABABU *et al.*, 2006; GHATULE *et al.*, 2012; KANAGASANTHOSH; SHANMUGAPRIYAN; KAVIRAJAN, 2015;

OSENI; AKWETEY, 2012; TEPONGNING *et al.*, 2018), ratos (ACHI *et al.*, 2018) e coelhos (BOADU *et al.*, 2011).

O extrato aquoso foi utilizado por via oral em camundongos nas doses de 200, 500, 1000 e 2500 mg/kg (DORABABU *et al.*, 2006) e 1250, 2500 e 5000 mg/kg (KINGSLEY *et al.*, 2012). O extrato foi considerado seguro em camundongos e nenhum efeito tóxico foi observado, sendo a DL₅₀ estimada em > 2500 mg/kg (DORABABU *et al.*, 2006) e > 5000 mg/kg (KINGSLEY *et al.*, 2012).

Outros estudos avaliaram a administração oral do extrato etanólico das folhas de *A. indica* em ratos (ACHI *et al.*, 2018) e camundongos (DORABABU *et al.*, 2006; GHATULE *et al.*, 2012; KANAGASANTHOSH; SHANMUGAPRIYAN; KAVIRAJAN, 2015; OSENI; AKWETEY, 2012; TEPONGNING *et al.*, 2018) e não foram observadas mudanças de comportamento ou morbidade significativas. Esses estudos utilizaram doses diferentes do extrato para estimar a DL₅₀, sendo a menor de 1000 mg/kg (OSENI; AKWETEY, 2012) e as maiores em DL₅₀ foram de 5000 mg/kg (ACHI *et al.*, 2018; TEPONGNING *et al.*, 2018). Tanto em ratos como em camundongos, a DL₅₀ estimada ficou estabelecida em uma dosagem maior que 5000 mg/kg. Tais resultados classificam os extratos aquoso e etanólico na categoria 5 no Sistema Globalmente Harmonizado de Rotulagem de Produtos Químicos – GHS (do inglês *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*).

2.5.2 Toxicidade reprodutiva

Os estudos que avaliam a toxicidade de uma substância química ou composto sobre a função reprodutora tornaram-se obrigatórios em razão das malformações observadas em crianças decorrentes do uso da substância talidomida por mulheres grávidas, sendo que o primeiro caso associado ao uso do fármaco foi reportado em 1956 (LENZ, 1988). Esse evento trágico despertou na comunidade científica a necessidade de realização de testes pré-clínicos para avaliação dos riscos do uso de medicamentos sobre a

fertilidade, desenvolvimento embrionário, fetal, peri e pós-natal (DENNY; FAQI, 2015).

Todavia, o processo reprodutivo é demasiadamente complexo e envolve inúmeras variáveis, razão pela qual, foram desenvolvidos diversos modelos animais (STARK; STEGER-HARTMANN, 2015). A utilização de animais ainda é a forma na qual é possível reunir o maior número de informação e permite predizer com maior segurança riscos de malformações, infertilidade, deficiências, etc. (EMA, 2019; STARK; STEGER-HARTMANN, 2015).

Assim, o episódio da talidomida impulsionou o desenvolvimento de guias para a condução de ensaios pré-clínicos de toxicidade reprodutiva por parte de entidades como *European Medicines Agency – EMA*, *The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use – ICH* e o *U.S. Food and Drug Administration – FDA*. No Brasil, o órgão equivalente é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa.

Os testes de toxicidade reprodutiva devem seguir protocolos harmonizados, caso se destinem a servir de subsídio para o registro de um medicamento. O guia para detecção de toxicidade reprodutiva para medicamentos de uso humano da EMA (*Guideline on Risk Assessment of Medicinal Products on Human Reproduction and Lactation: From data to labelling. EMA/CHMP/203927/2005. London, July 2008*) foi adotado como referência pela Anvisa. Esse guia serve para orientar as empresas quanto ao processo de integração entre dados de estudos não clínicos e clínicos para avaliação do risco toxicológico nas funções reprodutivas e na amamentação (BRASIL, 2014).

Por outro lado, quanto aos procedimentos a serem observados na condução de ensaios de toxicidade reprodutiva, a Anvisa adota o guia *ICH Detection of Toxicity to Reproduction For Human Pharmaceuticals S5(R2), 1993* (BRASIL, 2014). Neste guia, os testes de desenvolvimento embrio-fetal devem utilizar duas espécies: uma roedora, preferencialmente ratos, e uma não roedora, preferencialmente coelhos (BRASIL, 2014). Essa exigência visa aumentar a capacidade de detecção de sinais de malformações, visto que uma espécie de animal pode ser mais sensível do que outra (BRASIL, 2014).

Existem vários sinais clínicos observáveis durante o tratamento dos animais capazes de indicar possível toxicidade materna como: alteração no

peso corporal, consumo de alimento e água, alterações comportamentais, piloereção, diarreia, mortalidade materna, sangramento vaginal (CHAHOUUD *et al.*, 1999; KHERA, 1987).

Em outra direção, para avaliar a influência na capacidade reprodutiva masculina o uso da folha pulverizada de *A. indica* suspensa em água na dose de 100 mg/dia administrada a ratos albinos por 24 dias (GHODESAWAR *et al.*, 2004) e 48 dias (ALADAKATTI; AHAMED, 2005) foi realizada. Foram encontradas alterações na ultraestrutura das células epiteliais da cauda do epidídimo (GHODESAWAR *et al.*, 2004) e alterações nas células de Sertoli, com degeneração de células germinativas (ALADAKATTI; AHAMED, 2005). Outros efeitos sobre a função reprodutiva masculina com o extrato aquoso das folhas de *A. indica* foram analisados por 10 e 24 dias. Após 24 dias foram constatadas alterações nos parâmetros bioquímicos dos testículos e epidídimo (ALADAKATTI *et al.*, 2010), enquanto no estudo de 10 dias foi verificado apoptose do oócito (TRIPATHI; SHRIVASTAV; CHAUBE, 2012).

A toxicidade reprodutiva de fêmeas foi avaliada em ratas e coelhas (BABALOLA; AREOLA, 2010; SILVA *et al.*, 2015). As ratas grávidas foram tratadas com as doses de 65, 135 e 200 mg/kg do extrato etanólico das folhas de *A. indica* no 4º, 5º e 6º dias da gravidez e, posteriormente, durante o período de 15 dias da lactação. Nesse desenho experimental, o extrato não causou toxicidade às fêmeas, tampouco à prole (SILVA *et al.*, 2015). Da mesma forma, o extrato metanólico terpênico das folhas de *A. indica* administrado a coelhas grávidas do dia 14 a 24 da gestação na dose de 300 mg/kg/dia não induziu alterações ou efeitos tóxicos durante a gravidez e a prole (BABALOLA; AREOLA, 2010).

Embora os estudos de toxicidade aguda tenham mostrado que o extrato etanólico das folhas de *A. indica* apresenta baixa toxicidade ($DL_{50} \geq 5$ g/kg), isso não garante que o extrato seja seguro tanto para fêmeas prenhes como para o feto (ACHI *et al.*, 2018; TEPONGNIG *et al.*, 2018).

Tendo em vista que não foram realizados estudos de toxicidade materno-fetal em ratas tratadas durante todos os períodos gestacionais, é de suma importância avaliar os efeitos da administração do extrato seco etanólico de *A. indica* nessas circunstâncias.

2.5.3 Teste de genotoxicidade

Os testes de genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* têm como finalidade avaliar se as substâncias testadas possuem capacidade de causar mutações gênicas e alterações cromossômicas. Estas podem ser transmitidas para gerações futuras ou ser responsáveis pelo desenvolvimento de malignidades (BRASIL, 2019).

Segundo o Guia de avaliação de genotoxicidade de substâncias ou preparações herbais da EMA (*Guideline on the assessment of genotoxicity of Herbal substances/preparations, 2008*), três passos devem ser seguidos para avaliação do risco de genotoxicidade. O primeiro passo é a realização do teste de Ames em diferentes estirpes de *Salmonella typhimurium* com várias mutações presentes em um determinado gene responsável pela síntese de aminoácidos. O teste avalia a capacidade da substância de reverter as mutações e restaurar a capacidade funcional das bactérias. Esse teste pode gerar resultados falso positivos quando estão presentes compostos naturais como a quercetina (BRASIL, 2019). Nesse caso, são utilizados testes alternativos. Uma segunda etapa na análise da genotoxicidade consiste no ensaio em linfoma de camundongos com a finalidade de avaliar potencial dano aos cromossomos. Por último, caso os testes iniciais sejam positivos, deve ser realizado o teste do micronúcleo (BRASIL, 2019).

Recomenda-se a realização de análise de risco quando o teste de Ames for positivo ou quando o teste do micronúcleo em roedores for positivo. Neste trabalho foi realizado apenas o teste do micronúcleo, pois no extrato de folhas de *A. indica* normalmente encontram-se presentes quercetina e outros compostos correlacionados.

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a segurança materno-fetal, mutagenicidade e efeito hipoglicemiante do extrato seco obtido das folhas de *Azadirachta indica* em ratas Wistar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar o extrato seco das folhas de *Azadirachta indica*;
- Validar o método analítico de doseamento da rutina por CLAE-DAD;
- Avaliar se o tratamento com o extrato seco durante a gestação influencia nos parâmetros de toxicidade materna: ganho de massa corporal, consumo de ração e água, massa dos órgãos;
- Avaliar os efeitos da administração do extrato seco sobre os parâmetros de desempenho reprodutivo das progenitoras;
- Avaliar se o tratamento com o extrato seco altera os parâmetros bioquímicos de toxicidade hepática e renal das fêmeas prenhes;
- Avaliar se administração do extrato seco induz alterações histopatológicas nos rins, fígado, cornos uterinos e coração das progenitoras;
- Avaliar o efeito do tratamento com extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* sobre o desenvolvimento do esqueleto e órgãos fetais;
- Avaliar a genotoxicidade do extrato seco das folhas de *Azadirachta indica*;
- Avaliar o efeito hipoglicemiante do extrato seco das folhas de *Azadirachta indica*;
- Avaliar o efeito hipoglicemiante do extrato seco microencapsulado de *Azadirachta indica*.

4.1 Obtenção do extrato seco a partir das folhas de *Azadirachta indica*

4.1.1 Obtenção e caracterização do material vegetal

O material vegetal utilizado nesse trabalho foi obtido e caracterizado segundo métodos farmacopeicos por Soares (2020). Para tanto, as amostras de folhas de *A. indica* foram coletadas de árvores cultivadas em bosque, em frente a entrada da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Arroz e Feijão), na cidade de Santo Antônio de Goiás, Goiás, Brasil (S16° 30' 26,0994"; O 49° 16' 58,8720"; Altitude: 821m) em julho de 2018. A exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Goiás (UFG), registro nº UFG-48590. Após a coleta as folhas foram limpas em água corrente e água destilada e, em seguida, submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar (marca Solab e modelo SL-102) a 37 ± 5 °C até atingir valor de perda por dessecação entre 8 a 14% (SOARES, 2020). Após a secagem o material foi pulverizado em moinho de facas Marconi, modelo MA-580. A droga vegetal foi acondicionada em sacos plásticos escuros, identificados e armazenados ao abrigo de luz e umidade (SOARES, 2020).

4.1.2 Obtenção do extrato líquido

O extrato líquido das folhas de *A. indica* foi obtido conforme descrito por Soares (2020). Para tanto, utilizou-se aproximadamente 1,4 kg de droga vegetal pulverizada, que foram colocados em maceração por 24 horas em 5 L de etanol 30% (p/p). O macerado foi transferido para percoladores de aço inox, completados com 5 L de solução extrativa e deixados em repouso por

mais 24 horas. Após esse período foi iniciada a percolação propriamente dita, que foi mantida até a saturação do líquido extrator, com acréscimo de nova quantidade de líquido extrator. O processo foi mantido por mais 5 dias e consumiu aproximadamente 14 L de etanol 30% (p/p). O extrato coletado foi filtrado, acondicionado em frascos plásticos, rotulados e armazenados a – 20 °C até utilização nas etapas seguintes.

4.1.3 Concentração e caracterização do extrato líquido

O extrato líquido foi concentrado em evaporador rotativo (IKA modelo 10) à vácuo e os seguintes parâmetros foram utilizados: temperatura de 40 °C; rotação de 25 rpm e pressão de 70 bar. O processo de concentração produziu um volume aproximado de 5 L, que foi armazenado a –20 °C até ser utilizado nos ensaios de caracterização e produção do extrato seco.

O extrato líquido concentrado foi caracterizado quanto ao teor de sólidos pelo método de dessecação, em triplicata. Para tanto, foi utilizada a balança com aquecimento halógeno Shimadzu MOC63u na temperatura de 105 °C. A quantidade de extrato líquido concentrado utilizado foi de aproximadamente 1 g e o valor demonstrado no *display* da balança indica a perda por dessecação. Assim, o percentual de sólidos totais foi obtido de forma indireta pela Equação 1.

$$\text{Teor de sólidos (\%)} = 100 - U \quad (\text{Equação 1})$$

Em que: U = leitura apresentada no equipamento.

4.1.4 Obtenção e caracterização do extrato seco por aspersão (*spray drying*)

A formulação da mistura de extrato líquido concentrado das folhas de *A. indica* com os adjuvantes de secagem foi determinada a partir de revisões da literatura e da condução de experimentos preliminares de secagem, com foco

na obtenção de extrato seco com melhores rendimentos de secagem. Assim chegou-se à proporção de 45% de maltodextrina e 5% de dióxido de silício coloidal (Aerosil®) em relação ao teor de sólidos do extrato. Para o cálculo da quantidade de cada adjuvante a ser utilizada em relação a massa do extrato líquido concentrado das folhas de *A. indica* aplicou-se as Equações 2 e 3.

$$\text{Maltodextrina (g)} = M_{ext} \times T_s \times 0,45 \quad (\text{Equação 2})$$

$$\text{Aerosil® (g)} = M_{ext} \times T_s \times 0,05 \quad (\text{Equação 3})$$

Em que:

M_{ext} – Massa do extrato líquido etanólico concentrado de *A. indica* em gramas

T_s – Teor de sólidos em percentual

Portanto, para a obtenção do extrato seco por aspersão (*spray drying*), foram pesadas porções de 300 g de extrato líquido etanólico concentrado em bequer de 500 mL. Com auxílio de um agitador magnético e de uma barra magnética cada porção do extrato foi mantida em agitação a 25% de rotação. Posteriormente, pesou-se 7,64 g de maltodextrina e 0,84 g de dióxido de silício coloidal (Aerosil®) para cada porção de extrato. Os adjuvantes de secagem foram adicionados às porções lentamente, primeiro a maltodextrina e em seguida o Aerosil®. Após a completa adição dos adjuvantes de secagem, as misturas foram mantidas sob agitação por 5 minutos para completa homogeneização.

A secagem de cada porção foi realizada em *Spray Dryer* LABMAQ® - modelo LM-MSD 1.0, e foram utilizados os seguintes parâmetros de secagem:

- Temperatura de entrada – 140 °C
- Fluxo de alimentação do extrato – 0,63 L/h
- Diâmetro do bico de aspersão – 0,7 mm
- Fluxo do ar comprimido – 40 L/h
- Pressão do ar comprimido – 4,5 kg/f
- Temperatura de saída – 82 a 105 °C

Durante as secagens a temperatura do ambiente variou de 25,7 a 29,4 °C e a umidade relativa do ar de 45 a 56%.

O extrato seco foi caracterizado quanto aos seguintes parâmetros: rendimento de secagem, perda por dessecação, atividade de água (a_w), teor de flavonoides totais expressos como equivalentes de rutina, perfil cromatográfico para compostos fenólicos e teor de rutina, descritos a seguir.

4.1.4.1 Rendimento de secagem

O rendimento de secagem, expresso em percentagem, foi calculado pela relação entre o peso do extrato seco obtido no *spray dryer*, a massa de sólidos totais presente no extrato líquido concentrado utilizado no processo e os sólidos adicionados, conforme Equação 4.

$$RS = P1/P2 \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Em que:

RS – rendimento de secagem (%)

P_1 – peso do extrato seco obtido (g)

P_2 – massa de sólidos totais (incluindo a massa dos adjuvantes acrescentados) presentes na amostra (g)

4.1.4.2 Perda por dessecação

A perda por dessecação do extrato seco foi determinada em balança com aquecimento halógeno Shimadzu MOC63u. Cerca de 0,25 g do extrato seco foram aquecidos à temperatura de 105 °C, por aproximadamente 1 minuto, em triplicata.

4.1.4.3 Atividade de água

A atividade de água foi medida em triplicata com auxílio do equipamento PRE AQUA LAB modelo 450 com 0,2 g da amostra a 25 °C.

4.1.4.4 Teor de flavonoides totais expressos como rutina

A determinação do teor de flavonoides totais, expressos como rutina, foi realizada por método espectrofotométrico adaptado de Rolim *et al.* (2005) e validado por Soares (2020). Para tanto, foi construída uma curva de calibração com 7 níveis de concentração utilizando-se o padrão rutina (Sigma) nas concentrações (2,5; 5; 10; 20; 30; 40 e 50 µg/mL) preparados de maneira independente, em triplicata, em etanol 95% P.A./ácido acético 0,02 M (99:1). Foi realizada então a leitura da absorvância de cada repetição no espectrofotômetro UV-VIS da marca PerkinElmer, modelo Lambda 25 em comprimento de onda de 364 nm, utilizando etanol 95% P.A./ácido acético 0,02 M (99:1) como branco. A partir da leitura das absorvâncias foi construída a curva de calibração e realizada a análise de regressão linear para geração da equação da reta.

As amostras do extrato seco foram preparadas, em triplicata, com 0,1 g de extrato seco em 10 mL de etanol 30% (p/p) em balão volumétrico. Em seguida, o balão volumétrico foi levado a banho de ultrassom a 60 °C por 1 hora. Posteriormente, filtrou-se a solução e retirou-se 200 µL que foram adicionados a 3800 µL de solução etanol 95% P.A./ácido acético 0,02 M (99:1). Por último centrifugou-se a solução e realizou-se a leitura do sobrenadante em espectrofotômetro a 364 nm. Como branco uma solução contendo maltodextrina e aerosil nas mesmas quantidades que a amostra foi completada para 10 mL com etanol 30% (p/p) e levada para ultrassom 60 °C por 1 hora. A solução foi então filtrada em papel de filtro qualitativo e dela foram retirados 200 µL e adicionados 3800 µL de solução etanol 95% P.A./ácido acético 0,02 M (99:1), centrifugado e utilizado como branco antes das leituras das absorvâncias das amostras.

O teor dos flavonoides totais expressos como rutina foi calculado utilizando-se a fórmula descrita em Soares (2020) adaptada, conforme Equação 5.

$$TF (\%) = Ct \times (Vt/Va) \times 100 \times (Vs/ma) \quad (\text{Equação 5})$$

Em que:

TF = Teor de flavonoides totais, expressos como rutina

Ct = Concentração de flavonoides totais, expressos como rutina (g/mL)

Vt = Volume total da solução (etanol/ácido acético 0,02 M (99:1)) utilizada na leitura no espectrofotômetro (mL)

Va = Volume da amostra utilizado no preparo da solução para leitura no espectrofotômetro (mL)

Vs = Volume de etanol 30% (mL) usado na dissolução do extrato seco

Ma = Quantidade de extrato seco utilizado na dissolução (g)

4.1.4.5 Perfil cromatográfico para compostos fenólicos

A identificação de compostos fenólicos (flavonoides) presentes no extrato seco foi realizada pela comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) dos picos da amostra do extrato seco com os picos de padrões analíticos, obtidos por cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Para tanto, foi utilizado um cromatógrafo Agilent Technologies 1260 Infinity II, *software* Openlab CDS, equipado com detector DAD modelo G7115A e injetor automático. As eluições foram realizadas em coluna C18 Agilent Infinity Lab Poroshile 120, EC (4,6 x 100 mm, 2,7 µm) a temperatura de 30 °C. A fase móvel foi constituída por acetonitrila (A) e solução aquosa de ácido acético 0,2% (B), filtradas em membrana PTFE de 0,45 µm. O gradiente da fase móvel obedeceu aos seguintes critérios (A:B v/v): 0-5 min - 2:98; 5-8 min - 5:95; 8-11 min - 20:80; 11-14 min - 25:75; 14-21 min - 40:60; 21-24 min - 80:20; 24-27 min - 90:10; 27-30 min - 5:95 e 30-35 min - 2:98. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min, os picos foram detectados em 280, 306 e 340 nm, e o volume de injeção foi de 5,0 µL.

Os padrões analíticos dos compostos ácido gálico, ácido cafeico, resveratrol, catequina, epicatequina, apigenina, campferol, quercetina e rutina (Sigma Aldrich) foram preparados em metanol grau HPLC, na concentração de 2000 µg/mL, filtrados em membrana PTFE de 0,45 µm para *vials* âmbar e injetados individualmente. Um *vial* contendo a mistura, em partes iguais, de todos os padrões também foi preparado para injeção.

Para o preparo da amostra, 0,2 g de extrato seco foi diluído em metanol grau HPLC em balão volumétrico de 10 mL, sonificado por 15 minutos à 60 °C, em seguida filtrado em papel. O líquido recolhido foi centrifugado por 15 minutos e, finalmente, filtrado em membrana PTFE de 0,45 µm para vial âmbar.

4.1.4.6 Teor de rutina

O flavonoide rutina, composto majoritário nos extratos secos, foi determinado por CLAE-DAD, em condições semelhantes às descritas no item anterior, alterando-se apenas o gradiente da fase móvel e o comprimento de onda do detector, conforme segue (A:B v/v): 0-5 min - 5:95; 5-8 min - 20:80; 8-11 min - 25:75; 11-18 min - 40:60; 18-23 min - 5:95. O fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min, os picos foram detectados em 364 nm, o volume de injeção foi de 5,0 µL e a coluna (C18 Agilent Infinity Lab Poroshele 120, EC - 4,6 x 100 mm, 2,7 µm) foi mantida à temperatura de 30 °C. Esse método foi validado de acordo com critérios estabelecidos na RDC 166 da ANVISA (BRASIL, 2017). As etapas da validação do método estão descritas no item 4.1.5.

Rutina padrão analítico (Sigma, Alemanha) foi utilizada na confecção da curva de calibração, conforme descrito no item 4.1.5 (linearidade).

No preparo da amostra do extrato seco, 0,1 g foi diluído em metanol grau HPLC em balão volumétrico de 10 mL, sonificado por 15 minutos à 60 °C, em seguida filtrado em papel. O líquido recolhido foi filtrado em membrana PTFE 0,22 µm para vial âmbar.

A quantificação de rutina também foi realizada em amostras do extrato seco microencapsulado das folhas de *A. indica*, gentilmente cedidas por Soares (2020) para este trabalho. Informações detalhadas sobre a obtenção desse extrato encontram-se no pedido de patente n° BR 1020200203940, registrada no Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). No preparo da amostra do extrato seco microencapsulado, 0,5 g foi diluído em metanol grau HPLC em balão volumétrico de 10 mL, sonificado por 1 hora à 60 °C, em seguida filtrado em papel. O líquido recolhido foi filtrado em membrana PTFE 0,22 µm para vial âmbar.

Todas as amostras de extratos foram preparadas em sextuplicatas independentes e os teores de rutina, expressos como a média (\pm DP), foram calculados conforme a Equação 6.

$$Tr (\%) = Cr \times (Vt/Ma) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Em que:

Tr(%) = Teor de rutina

Cr = Concentração de rutina (g/mL)

Vt = Volume total da solução/amostra (mL)

Ma = Massa de extrato seco utilizado na dissolução/amostra (g)

4.1.5 Validação do método analítico de doseamento da rutina por CLAE/DAD

A validação do método analítico foi realizada atendendo aos requisitos da RDC Nº 166 de 2017, da ANVISA, para os parâmetros seletividade, linearidade, efeito matriz, faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez (BRASIL, 2017). A Substância Química de Referência – SQR utilizada foi a rutina, composto majoritário encontrado nos extratos seco e microencapsulado das folhas de *A. indica*.

A adequabilidade do sistema cromatográfico (*system suitability*) foi testada para garantir a eficiência das condições cromatográficas empregadas. Para tanto, foram determinados os seguintes parâmetros de adequação do sistema: resolução, fator de retenção (K), número de pratos teóricos, seletividade e simetria. Esses parâmetros foram calculados pelo *software* Openlab CDS e comparados com os limites recomendados pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 1994).

A seletividade do método foi atestada por meio da comparação do perfil cromatográfico dos extratos, da rutina e do diluente (metanol). Ademais, foi realizada a análise comparativa dos espectros de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) do pico da rutina na amostra e no padrão, no comprimento de onda de 364 nm.

O parâmetro linearidade avaliou a resposta analítica em função da concentração de rutina, utilizada como substância química de referência

(SQR). Para tal fim, 0,02 g de rutina foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com metanol grau HPLC. Posteriormente, levou-se para ultrassom até completa dissolução, obtendo uma solução mãe na concentração de 2000 µg/mL. Dessa solução mãe foram preparadas as concentrações de 20, 30, 50, 100, 200 e 300 µg/mL da SQR, em triplicata, de maneira independente, para volumes finais de 5 mL, conforme apresentado na Tabela 1. As diferentes soluções foram filtradas em filtro PTFE de 0,22 µm para vials de 2 mL e injetadas no CLAE-DAD nas condições cromatográficas descritas no item 4.1.4.6.

Tabela 1 – Diluições realizadas na solução mãe (rutina 2000 µg/mL) para obtenção dos 6 níveis concentrações da linearidade

Concentração do padrão Rutina (µg/mL) a ser obtida	Quantidade de solução-mãe (Rutina 2000 µg/mL)	Volume final em metanol
20	0,05 mL	5 mL
30	0,075 mL	5 mL
50	0,125 mL	5 mL
100	0,25 mL	5 mL
200	0,5 mL	5 mL
300	0,75 mL	5 mL

Com auxílio do software Action Stat (versão 3.5) extensão do excel 2016 realizou-se a representação gráfica da resposta (áreas dos picos da SQR) em função das concentrações; obtenção da equação da reta pelo método dos mínimos quadrados ponderados; geração do gráfico de dispersão dos resíduos; obtenção dos coeficientes de correlação (r) e de determinação (r²). O nível de significância utilizado foi de 5% atendendo aos requisitos da RDC n° 166 da Anvisa (BRASIL, 2017).

O efeito matriz foi avaliado por meio da comparação entre os coeficientes angulares de duas curvas de calibração, uma construída com amostras do extrato adicionadas de rutina (SQR) de forma a obter as mesmas concentrações do intervalo linear e outra construída com a SQR isolada (dados da linearidade). Para obtenção dos extratos adicionados com a SQR foi preparada uma solução mãe contendo a amostra (extrato seco) adicionada do padrão (rutina) de tal forma que a concentração de rutina fosse de 2000 µg/mL. Para tanto, preparou-se uma solução contendo 70% de rutina padrão

e 30% de rutina da amostra, em 10 mL. Sendo assim, foram necessários 0,014 g de rutina padrão e 0,006 g de rutina proveniente do extrato seco. O cálculo abaixo demonstra a quantidade de extrato seco pesada para fornecer 0,01 g de rutina.

O extrato possui 1,0536749% de rutina:

$$\begin{array}{l} 100 \text{ g de extrato} \text{-----} 1,0536749 \text{ g de rutina} \\ X \text{-----} 0,006 \text{ g} \\ X = 0,56943 \text{ g de extrato} \end{array}$$

Logo:

Foram pesados 1,13886 g (dobro do valor calculado anteriormente) de extrato seco, que foi transferido para balão volumétrico de 20 mL (dobro do volume calculado anteriormente), completado com metanol grau HPLC e levado para ultrassom por 15 minutos à 60 °C, filtrado por filtração simples ainda quente. Pesou-se 0,01g de rutina padrão, transferiu-se para balão de 10 ml e completou-se com o filtrado anterior. Após completado o volume o balão foi levado ao banho de ultrassom para homogeneização por 15 minutos.

Dessa solução mãe foram preparadas as diluições para obtenção das concentrações (20; 30; 50; 100; 200; 300 µg/mL) preparados de maneira independente, em triplicata, em metanol.

A finalidade do teste foi avaliar a existência ou não de paralelismo entre as retas, pois a falta de paralelismo indica uma possível interferência de componentes da matriz na análise.

A precisão do método analítico foi avaliada com o intuito de comprovar a proximidade entre os resultados obtidos em ensaios realizados com a amostra nas condições a serem validadas. Para expressar a precisão foram testados dois níveis, a repetibilidade e a precisão intermediária. Para a repetibilidade, amostras do extrato foram preparadas em sextuplicata, por um analista, nas mesmas concentrações (correspondente a 100% da SQR no extrato). Para a precisão intermediária, amostra do extrato em sextuplicata foram preparadas de modo idêntico, mas por outro analista e em dia diferente. Para o preparo das amostras 0,1 g do extrato seco foi diluído em metanol grau HPLC em balão volumétrico de 10 mL, sonificado por 15 minutos à 60 °C, em

seguida filtrado em papel. O líquido recolhido foi filtrado em membrana PTFE 0,22 µm para vial âmbar para as injeções no CLAE-DAD, nas condições cromatográficas descritas no item 4.1.4.6. Os resultados foram expressos como a média e o desvio padrão relativo (DPR%) das concentrações de rutina nas amostras, determinadas com o auxílio da equação da reta gerada na linearidade.

A exatidão foi determinada dentro da faixa linear do método analítico utilizando o método da recuperação após adição da SQR. Para tanto, quantidades idênticas e conhecidas da SQR (50 µg/mL) foram adicionadas às amostras de extrato seco preparadas para conter três níveis de concentrações (baixa 80%; intermediária 100% e alta 120%) de rutina, dentro da faixa linear do método analítico. Cada faixa de concentração foi realizada em triplicata e a média das medidas foi utilizada para o cálculo do percentual de recuperação de acordo com a Equação 7 (BRASIL, 2017; PAULA; AMARAL, 2022).

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_e(\text{amostra adicionada}) - C_e(\text{amostra})}{C_{Tr}} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Em que:

C_e - é a concentração da rutina nas amostras medida experimentalmente;

C_{Tr} - concentração teórica de rutina padrão adicionada

De acordo com RDC nº 166/2014 o DPR deve ser justificado e calculado para cada concentração na exatidão e o impacto das variações propostas na robustez devem ser avaliados com os mesmos critérios utilizados na exatidão (BRASIL, 2014).

O critério de aceitação para o DPR na exatidão, precisão e robustez foram baseados na concentração do analito na amostra (BRASIL, 2014). A Equação 8 de *Horwitz* foi utilizada para determinação do DPR aceitável. Este valor independe da matriz e do tipo do analito e leva em consideração a concentração do analito na amostra (BRASIL, 2020), conforme se segue:

$$DPR_{ac} = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (\text{Equação 8})$$

Em que:

Desvio Padrão Relativo aceitável (DPR_{ac});

C – concentração do analito na amostra em g/ml.

Os limites de detecção e de quantificação foram estimados a partir dos dados da curva de calibração das medidas realizadas na linearidade, com auxílio do software *Action Stat* (versão 3.5) conforme as Equações 9 e 10, respectivamente:

Limite de detecção:

$$LD = (3,3 \times \sigma) / IC \quad (\text{Equação 9})$$

Limite de quantificação:

$$LQ = (10 \times \sigma) / IC \quad (\text{Equação 10})$$

Em que:

σ - é o desvio padrão residual da linha de regressão;

IC - é a inclinação da curva de calibração.

A robustez foi determinada a partir de pequenas alterações no método analítico descrito em 4.1.4.6, com a finalidade de averiguar eventual impacto na capacidade do método de identificar e quantificar a rotina com precisão e exatidão. Para tanto, foram realizadas análises com as temperaturas da coluna a 27 °C, 30 °C, 33 °C; com amostras armazenadas, após preparo, por 24 horas a -20 °C e sem prévio armazenamento; por fim, foram feitas análises nos comprimentos de onda de 362, 364 e 366 nm. As alterações foram realizadas uma de cada vez e em triplicata.

4.2 Testes com animais

4.2.1 Aspectos éticos

Todos os experimentos deste estudo estão em acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) e foram iniciados após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEG, parecer n.002/2020 (Anexo 1).

4.3 Animais

No estudo de toxicidade reprodutiva e de desenvolvimento foram utilizadas 40 ratas *Wistar* adultas, fêmeas, pesando aproximadamente 165 a 210 g e 6 ratos machos adultos destinados apenas ao acasalamento. No teste do efeito hipoglicemiante foram utilizados 24 ratos *Wistar* machos e adultos. Durante o estudo os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais e Sintéticos da UEG, alocados em grupos de quatro animais, em caixas de polipropileno (41 cm x 34 cm x 16 cm) contendo maravalha (J.R. Maravalha). A temperatura ambiente foi mantida em 22 ± 2 °C, a umidade relativa do ar em $55 \pm 5\%$, e ciclo de claro/escuro de 12 h. Foi disponibilizada ração comercial (Presence®) e água filtrada *ad libitum* aos animais durante todo o estudo.

4.4 Estudo de toxicidade reprodutiva

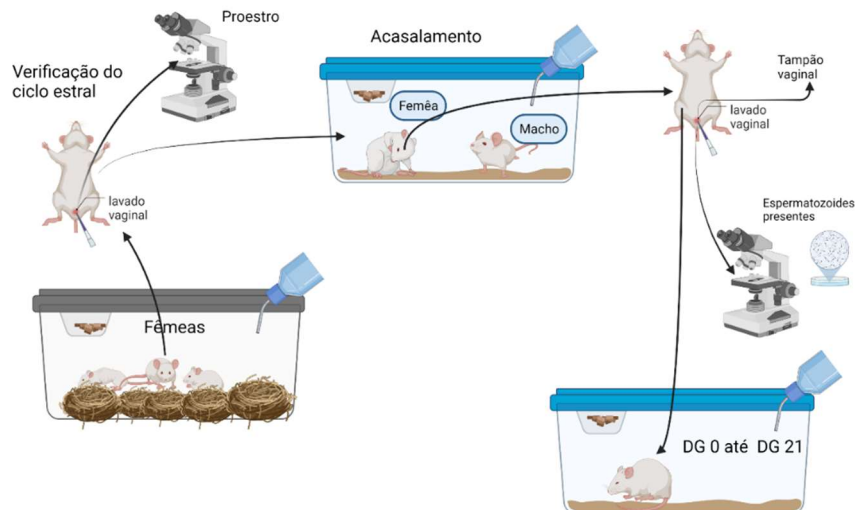
O teste de toxicidade reprodutiva foi realizado e conduzido segundo o preconizado no Protocolo 421 da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development* - OECD) (OECD, 2016).

4.4.1 Acasalamento

As fêmeas foram submetidas diariamente à coleta de secreção vaginal para determinação do ciclo estral, sendo esse procedimento realizado com auxílio de uma micropipeta, solução fisiológica 0,9% e microscópio óptico. Constatada a fase do ciclo como sendo o pró-estro, as fêmeas foram colocadas individualmente em caixas de polipropileno na presença de um macho. No dia posterior, no período matutino, a presença de tampão vaginal

e/ou de espermatozoides no lavado vaginal foi considerada como dia gestacional zero (DG 0). As fêmeas prenhes foram mantidas em caixas individualizadas até o dia da eutanásia (DG 21). Esses procedimentos encontram-se ilustrados na Figura 2.

Figura 3 – Desenho esquemático do procedimento de seleção e acompanhamento dos animais até a inclusão no estudo



Fonte: Próprio autor, criado com Biorender.com.

4.4.2 Grupos experimentais e tratamento

As ratas prenhes foram distribuídas em quatro grupos (n= 10/grupo): um controle e três grupos tratamento. No grupo controle foram alocadas as fêmeas que receberam o veículo utilizado na dissolução do extrato seco. O veículo foi constituído de água destilada, propilenoglicol 10%, maltodextrina 45% e Aerosil® 5%. A maltodextrina e o Aerosil® são adjuvantes de secagem amplamente utilizados na secagem de extratos vegetais e na indústria farmacêutica como excipientes. Ademais, são reconhecidos como seguros segundo a classificação *Generally Recognized As Safe* – GRAS adotada pelo FDA (SHESKEY; COOK; CABLE, 2017).

As fêmeas dos outros três grupos receberam o extrato seco das folhas de *A. indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg. As doses do extrato seco

foram definidas de acordo com os dados obtidos em estudo de toxicidade aguda e dose repetida com extrato etanólico das folhas de *A. indica* (TEPONGNING *et al.* 2018; OECD, 2016). O uso de tais informações decorre do protocolo 421 da OECD. Nele recomenda-se a utilização de 3 níveis de dose sendo a mais alta capaz de causar algum efeito adverso sem causar morte e a dose menor não deve causar efeito adverso observável (OECD, 2016). Nos testes realizados por Tepongning *et al.* (2018) a DL 50 estimada foi > 5000 mg/kg e a toxicidade dose repetida com 75, 125 e 300 mg/kg/dia por 28 dias não apresentou toxicidade. Logo a dose menor foi estabelecida em 300 mg/kg sendo as doses subsequentes múltiplos dessa dose. Os valores das doses expressam apenas o equivalente em extrato bruto da planta sem a massa dos adjuvantes.

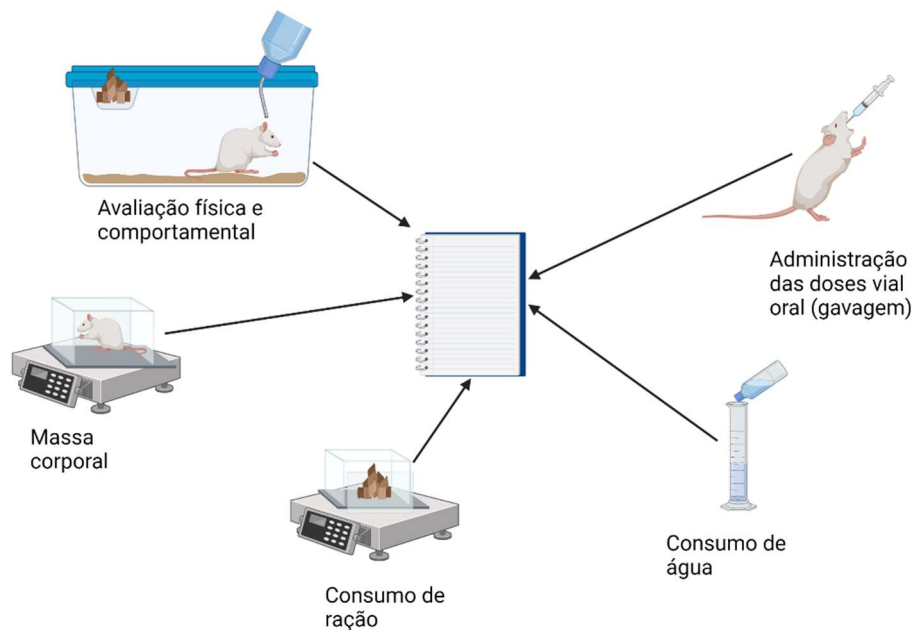
O veículo e o extrato foram administrados às fêmeas por via oral (gavagem), utilizando o volume de 5 mL/kg de animal. O tratamento foi realizado do dia gestacional zero (DG 0) ao vinte (DG 20).

4.4.3 Avaliação da toxicidade materna do extrato seco das folhas de *Azadirachta indica*

A toxicidade materna foi avaliada utilizando-se o protocolo n. 421 da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development - OECD*) (OECD, 2016).

Foram registrados diariamente a massa corporal, o consumo de água e ração das fêmeas prenhes (Figura 4). Além disso, todos os dias as progenitoras foram avaliadas quanto a possíveis alterações físicas e comportamentais (aumento ou diminuição da atividade motora, piloereção, diarreia, *grooming* persistente) que pudessem indicar sinais clínicos de toxicidade (MALONE, 1983).

Figura 4 – Desenho esquemático dos procedimentos de acompanhamento dos animais durante o tratamento com controle e com extrato seco das folhas de *Azadirachta indica*



Fonte: Próprio autor. Criada no Biorender.com

4.4.4 Avaliação dos parâmetros de desempenho reprodutivo materno

No DG 21, no período matutino, após a realização da pesagem e verificação do consumo de água e ração das fêmeas, elas foram anestesiadas com uretana 25% (Sigma®), via intraperitoneal, na dose de 1 g/kg. Em seguida, foi realizada a laparotomia e uma incisão longitudinal na região alba até a cartilagem xifóide das fêmeas, com posterior abertura da cavidade torácica. Esse procedimento promoveu a eutanásia das ratas e permitiu a retirada dos cornos uterinos, ovários e fetos. Uma vez retirados do interior do útero, os fetos foram separados das suas placentas para a realização do exame macroscópico visando a detecção de anormalidades externas. Os fetos, ainda sob efeito da anestesia materna, foram colocados em placa de Petri coberta por papel alumínio e colocados no congelador a 4 °C por 5 a 10 minutos. O referido procedimento promoveu a eutanásia dos fetos, que foi confirmada pela ausência de movimentos respiratórios e da resposta

autônômica ao toque. Na sequência, os fetos e as suas placentas foram individualmente pesados.

Foram registrados o número de sítios de implantação e reabsorções presentes nos cornos uterinos. A análise dos ovários foi realizada com auxílio de um estereomicroscópio com a finalidade de contar o número de corpos lúteos (DAMASCENO *et al.* 2008). Foram utilizadas as fórmulas do índice de prenhez, perdas pré e pós-implantação para cálculo dos índices reprodutivos (EPA, 1991):

$$\text{Índice de prenhez} = \frac{(N^{\circ} \text{ de fêmeas prenhes})}{((N^{\circ} \text{ de fêmeas com evidência de prenhez}))} \times 100$$

$$\text{Perda pré-implantação} = \frac{((N^{\circ} \text{ de sítios de corpos lúteos} - N^{\circ} \text{ de sítios de implantação}))}{((\text{número de corpos lúteos}))} \times 100$$

$$\text{Perda pós-implantação} = \frac{((N^{\circ} \text{ de sítios de implantação} - N^{\circ} \text{ de fetos vivos}))}{(N^{\circ} \text{ de sítios de implantação})} \times 100$$

4.4.5 Massa dos órgãos e análise histopatológica

Após o registro dos parâmetros de desempenho reprodutivo materno, o fígado, o coração, os rins e os pulmões foram removidos, pesados e fixados em formol a 10% (Dinamica Química Contemporânea, Ltda. São Paulo, SP, Brasil). Os cornos uterinos também foram fixados. Após essa etapa foi realizado processo de desidratação por meio de concentrações crescentes (70% 85% e 99 %) de álcool etílico (Neon Commercial Analytical Reagents, Ltd., Suzano, SP, Brasil) e posterior depuração em xileno (Labsynth Laboratory Products, Ltd., Diadema, SP, Brasil). Os tecidos foram embebidos em parafina por 2h e após a confecção dos blocos foram seccionados (5 µm) em micrótomo (Leica Biosystems of Brazil Import and Trade, Ltd., São Paulo, SP, Brasil). As lâminas foram coradas por hematoxilina (Laborclin Laboratory Products, Ltd., Pinhais, PR, Brasil) e eosina (Labsynth Laboratory Products, Ltd., Diadema, SP, Brasil) e visualizadas em microscópio óptico (Nikon

Instruments Inc., Melville, NY, EUA). Os cortes foram analisados em microscopia de luz (40x). Cem campos de microscópio por seção foram pontuados de acordo com a área com lesões inflamatórias em relação à área de campo. Os processos patológicos (edema, necrose, infiltrado celulares/inflamatórios, hiperemia, angiogênese, fibrose, etc) foram descritos quando presentes. Os dados das análises semiquantitativas foram avaliados de acordo com o agrupamento do estudo.

4.4.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos maternos

No dia da cesariana, após anestesia, foram realizadas punções intracardíacas para coleta de 5 mL de sangue total das fêmeas. O sangue foi transferido para microtubos e centrifugado por 4 minutos a 4000 rpm à temperatura de 4 °C. O soro obtido foi conservado a -20 °C até a realização das dosagens de creatinina, ureia, transaminases glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), fosfatase alcalina (FA), proteínas totais e albumina. Os doseamentos foram realizados no equipamento Vyttra diagnosticos BM 200 equipado com o software BS200E Mindray® e os kits reagentes foram Bioclin Biocontrol P® lote 0052, val: 2022/7 e Bioclin Biocontrol N® lote 0068 , val: 2023/01.

4.4.7 Morfologia externa e medidas morfométricas fetais

Nesta etapa, os fetos foram analisados visualmente para identificação de malformações ou anomalias externas. Foram registradas as medidas ântero-posterior do crânio, laterolateral do crânio, anteroposterior do tórax, laterolateral do tórax, craniocaudal e cauda determinadas com auxílio de um paquímetro digital (Zaas Precision®). Após a determinação das medidas morfométricas os fetos foram distribuídos em dois grupos, sendo uma metade destinada a análise visceral e a outra para análise esquelética.

4.4.8 Análise esquelética dos fetos

Os fetos selecionados para análise esquelética foram diafanizados e colorados com vermelho de alizarina por meio da utilização das técnicas adaptadas de Manson, Zenick e Costlow (1982) e Kelly e Bryden (1983). Para tanto, os fetos foram desidratados com álcool 96 °GL por 8 dias, para então serem submetidos a etapa de evisceração. Com um bisturi, foi realizado um corte transversal no abdome dos fetos, imediatamente abaixo das costelas para retirada completa das vísceras. Em seguida os tecidos moles foram clareados utilizando-se KOH 2% por 24 horas. Terminado esse prazo, os fetos foram imersos em uma solução de KOH 0,5% com vermelho de alizarina por mais 48 horas com objetivo de corar as estruturas ósseas. Finalizada a etapa de coloração, os fetos foram colocados em glicerina 25% para fixação por uma semana e mantidos até a análise esquelética em glicerina pura.

Concluída a coloração, os fetos foram analisados em estereomicroscópio com intuito de identificar presença de variações/malformações ósseas. Foi utilizado o *Atlas of external and skeletal anomalies in rats* para comparar as alterações observadas (CHAHOU, 1999). A descrição das alterações esqueléticas foi padronizada segundo as terminologias da *International Federation of Teratology Societies* (MAKRIS *et al.*, 2009).

4.4.9 Análise visceral dos fetos

Os fetos destinados à análise visceral foram imersos em solução de Bodian por aproximadamente 30 dias e, em seguida, foram submetidos ao procedimento de secção com bisturi (DAMASCENO *et al.*, 2008; WILSON, 1965). Cada secção foi analisada no estereomicroscópio e as variações/malformações foram registradas (DAMASCENO *et al.*, 2008).

4.5 Teste do micronúcleo (MN)

As recomendações da diretriz 474 da OCDE (OECD, 2014) foram seguidas para a realização do teste MN. As células da medula óssea das ratas Wistar foram suspensas em 1 mL de soro fetal bovino e depois utilizadas para preparar os esfregaços celulares em lâminas de vidro (quatro lâminas para cada animal). Em seguida, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por

5 min, e então coradas em solução tamponada de Giemsa (fosfato de sódio dibásico e fosfato de sódio monobásico, pH 6,8). A relação entre eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos totais (eritrócitos normocromáticos (NCE) + (PCE)) e a relação entre PCE e NCE foram calculadas contando-se 500 eritrócitos por animal. A incidência de eritrócitos imaturos micronucleados (MN-PCEs) foi calculada contando um total de 4000 PCE por animal. A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico de luz (Olympus BH-2, objetiva 100x10x100, Tóquio, Japão).

4.6 Avaliação do efeito hipoglicemiante

4.6.1 Indução do estado diabético

A hiperglicemia foi induzida em ratos Wistar (n=6/grupo) randomicamente selecionados, pela administração de aloxana (5,6 Dioxiuracil monohidrato) na dose de 150 mg/kg, que possui um efeito tóxico sobre as células beta das ilhotas de Langerhans, no pâncreas (ZAREIE, 2018; GUO, 2017; SILVA, 2014), via i.p., aos animais em jejum de 10 – 12 horas (CAVALLI *et al.*, 2007; FEDERIUK *et al.*, 2004; LERCO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2000; ZANOELLO *et al.*, 2002). Após a administração, os animais ficaram em jejum por mais duas horas até liberação da ração. Durante todo o experimento a oferta de ração e água foi livre.

Após três dias da administração de aloxana foi realizada a mensuração da glicose sanguínea dos animais utilizando o glucoteste Accu Check Guide®, sem que os ratos estivessem em jejum. Foram considerados hiperglicêmicos os animais que mantiveram valores glicêmicos ≥ 200 mg/dL do terceiro ao sétimo dia após a administração da aloxana (AKINOLA, 2011). No sétimo dia, permanecendo o estado hiperglicêmico, o animal foi incluído no grupo. Aos animais que não desenvolveram hiperglicemia uma segunda dose de aloxana foi administrada após jejum de 4 horas antes da dose e de 2 horas após a dose. A Figura 5 ilustra a linha do tempo e etapas da indução da hiperglicemia.

Figura 5 - Linha do tempo com as etapas da indução da hiperglicemia em ratos Wistar machos e adultos



Fonte: Próprio autor

4.6.2 Grupos experimentais e tratamento

Nesta etapa do trabalho foram testadas amostras do extrato seco das folhas de *A. indica* (ES) obtidas conforme descrito no item 4.1.4, e amostras do extrato seco microencapsulado (ESM) de folhas de *A. indica*, gentilmente cedidas por Soares (2020) e produzidas conforme procedimentos descritos no pedido de patente n° BR 1020200203940 registrado no INPI. O objetivo foi investigar possíveis influências da tecnologia da microencapsulação num eventual efeito hipoglicemiante dos extratos.

Para tanto, os animais foram distribuídos em quatro grupos (n=6/grupo), de forma randomizada, após a confirmação da indução de hiperglicemia. Dois grupos de animais diabéticos foram tratados com a dose de 750 mg/kg, por via oral, com o extrato seco (Grupo ES) e com extrato seco microencapsulado (Grupo ESM), preparados em água purificada e 10% de propilenoglicol. A dose foi escolhida com base em estudos que avaliaram o efeito hipoglicemiante e a toxicidade aguda de extratos brutos de folhas de *A. indica* (AKINOLA, 2010; AKTER, 2014; TEPONGNING *et al.*, 2018). O valor da dose expressa apenas o equivalente em extrato bruto da planta, sem a massa dos adjuvantes de secagem. Outros dois grupos foram formados por animais diabéticos que receberam, por via oral, o veículo usado no preparo dos tratamentos com os adjuvantes presentes nos extratos avaliados. Assim, um grupo recebeu microcápsulas inertes (Grupo veículo MI), produzidas de forma idêntica e com os mesmos adjuvantes utilizados na secagem do ESM, no entanto, sem a presença do extrato, que foram dissolvidas em água e 10% de propilenoglicol. O outro grupo recebeu maltodextrina e aerosil® (Grupo veículo MA), nas mesmas proporções utilizadas na secagem do ES, dissolvidos em água e 10% de propilenoglicol.

Os tratamentos e os veículos foram administrados por via oral (gavagem) por 15 dias. Os animais tiveram suas massas corporais e sinais clínicos observados diariamente. O consumo de água e ração foi registrado por caixa contendo entre três e dois animais.

4.6.3 Aferição da glicemia

A glicemia dos animais em todos os grupos foi mensurada nos dias 0, 3, 6, 9, 12 e 15 às 10 horas da manhã em sangue coletado da cauda do animal. Para realização do procedimento o animal foi contido dentro de um tubo de PVC com aberturas para respiração e para cauda. A cauda do animal foi imersa em água morna a 40 °C por cerca de 50 segundos para vasodilatação. Posteriormente, a cauda foi seca com papel toalha e limpa com etanol 70%. Com uma lanceta realizou-se a punção na região distal da cauda do animal e uma gota de sangue foi utilizada para colocar na fita reagente do glicosímetro previamente encaixada.

4.7 Análise estatística

Os dados referentes ao consumo de água e ração, ganho de massa corporal, parâmetros bioquímicos e de desempenho reprodutivo materno, glicemia e teste do micronúcleo estão apresentados como média \pm desvio padrão da média. Estes dados foram submetidos à ANOVA unifatorial. Nos casos em que a ANOVA apontou efeito significativo ($p \leq 0,05$) foi realizado o teste *post hoc* de comparações múltiplas de Newman Keuls ou comparação múltipla de Tukey. Para alterações esqueléticas e viscerais foi utilizado o teste do qui quadrado. Constatada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos foi aplicada a correção de Bonferroni para as comparações entre grupos sendo significativo um $p < 0,0083$.

No teste de efeito hipoglicemiante utilizou-se a ANOVA para medidas repetidas. Quando a ANOVA apontou efeito significativo ($p \leq 0,05$) foi realizado o teste de F de comparações planejadas para avaliar a glicemia antes do tratamento (D0) em relação aos dias D3; D6; D9; D12 e D15.

Para a análise estatística foi utilizado o software *Statistica* 12.0 da Statsoft® para os estudos de toxicidade reprodutiva, de desenvolvimento embrio-fetal e efeito hipoglicemiante. Para os parâmetros PCE/NCE, PCE/total, a média \pm desvio padrão das medianas foram calculadas para cada grupo. As análises foram realizadas no software Graph-Pad Prisma 9 versões 9.0.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extrato líquido concentrado

Após o processo de concentração foram obtidos 5 L de extrato líquido. O teor de sólidos foi de 5,66%. Esse valor foi utilizado para estimar as massas de adjuvantes a serem adicionados para a secagem por aspersão.

5.2 Obtenção e caracterização do extrato seco por aspersão (*spray drying*)

Foram realizadas 5 secagens no *spray dryer* (Figura 6A) e foram produzidos 170,653 g de extrato seco (Figura 6B). O rendimento médio de secagem foi de 50,89%. O extrato seco apresentou perda por dessecação de $6,87\% \pm 0,47\%$ e atividade de água de $0,346 \pm 0,01$. A atividade de água igual ou inferior a 0,75 medidos a 25 °C são considerados valores baixos segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª edição. Esse parâmetro indica um atributo de qualidade ao extrato seco ao conferir maior estabilidade química e menor risco de contaminação microbológica devido a menor quantidade de água livre (BRASIL, 2019).

Grande parte dos extratos de *A. indica* utilizados nos estudos de efeito hipoglicemiante e de toxicidade relatados na literatura eram extratos brutos concentrados em rotaevaporador a pressão reduzida. Nesses extratos, devido a um possível conteúdo de água residual, faz-se necessário o armazenamento a baixas temperaturas (4 °C) para garantir a estabilidade. Por outro lado, o extratos secos obtidos por *spray drying*, pela adição de adjuvantes e características do processo de secagem, são obtidos extratos em pó com umidade residual baixa e, conseqüentemente, mais estáveis. Essa tecnologia permite a utilização de altas temperaturas durante a secagem sem

provocar prejuízos para os constituintes do extrato (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010; ZIAEE *et al.*, 2019). Dessa forma, o extrato seco de *A. indica*, obtido por *spray drying* nas condições deste estudo, pode ser armazenado a temperatura ambiente protegido da luz e umidade.

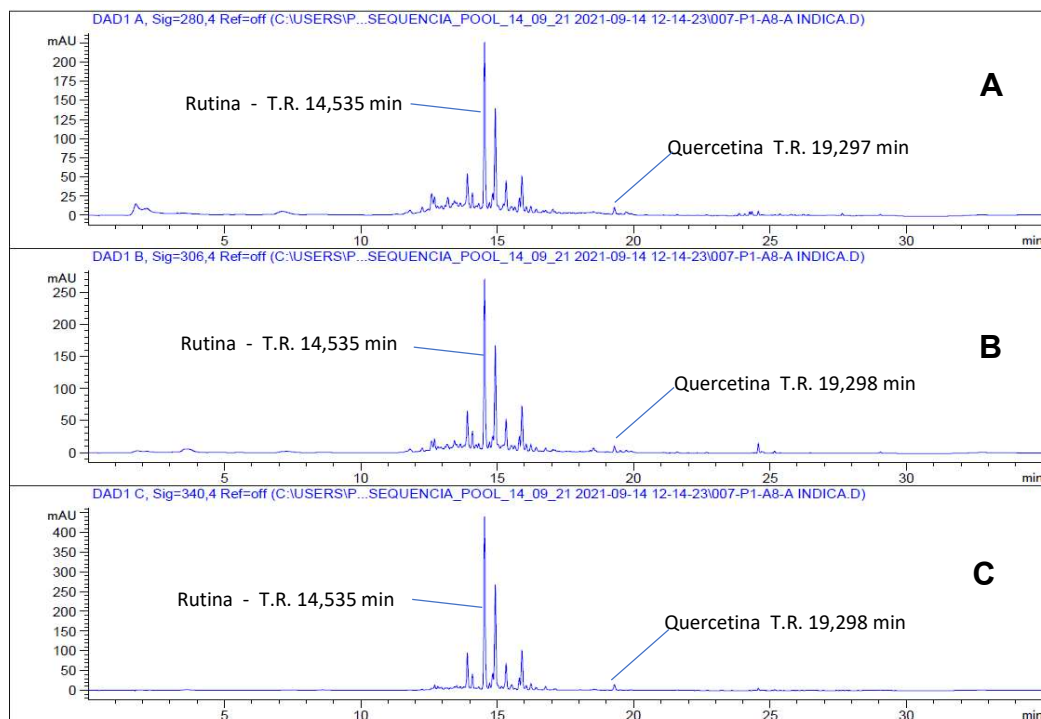
Figura 6 – Secagem por aspensão do extrato bruto concentrado com adição de adjuvantes. (A) *Spray Dryer*, (B) Extrato seco obtido



Fonte: Próprio autor

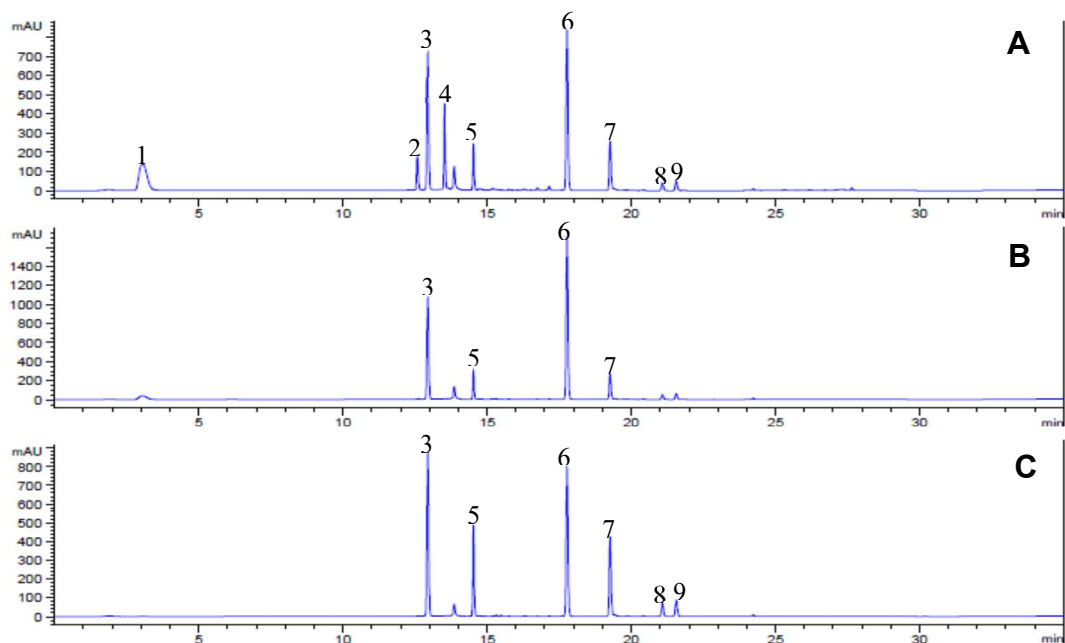
Os perfis cromatográficos do extrato seco das folhas de *A. indica* e dos padrões analíticos são apresentados, respectivamente, nas Figuras 7 e 8. A análise qualitativa realizada para identificação dos compostos fenólicos presentes no extrato seco de *A. indica* foi positiva para rutina e quercetina. Conforme verificado pelos tempos de retenção 14,535 e 19,298 minutos dos picos do extrato seco (Figura 6B) com os tempos de retenção dos picos dos padrões rutina (14,531 min) e quercetina (19,267 min) (Figura 8). Adicionalmente, os espectros na região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis) referentes a cada pico (Figura 9) apresentam semelhança quantos aos máximos de absorção nas regiões de 250 nm e 360 nm no caso da rutina e de 260 nm e 370 nm no caso da quercetina.

Figura 7 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD do extrado seco de *Azadirachta indica*. A, 280 nm; B, 306 nm; C, 340 nm.



T.R. – Tempo de retenção

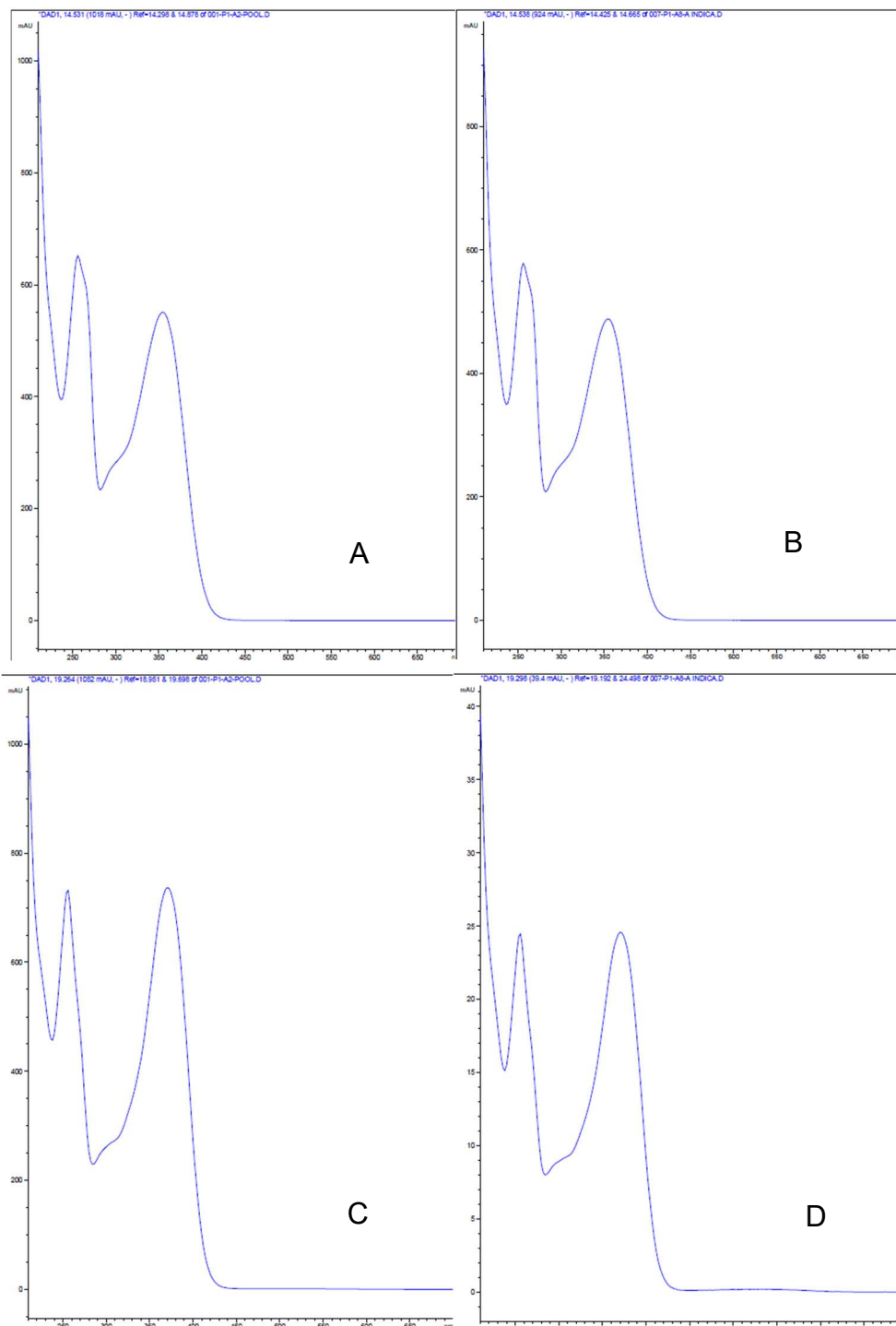
Figura 8 – Cromatogramas obtidos em CLAE-DAD dos padrões de referência. A, 280 nm. B, 306 nm. C, 340 nm.



Legenda: 1 – ácido gálico (RT=3,043 min); 2 – catequina (RT=12,582 min); 3 – ácido cafeico (RT=12,942 min); 4 – epicatequina (RT=13,527 min); 5 – rutina (RT=14,531 min); 6 –

resveratrol (RT=17,773 min); 7 – quercetina (RT=19,267 min); 8 – apigenina (RT=21,085 min); 9 – kaempferol (RT=21,561 min).

Figura 9 - Espectros de absorção na região UV-Vis. A, rutina padrão; B, rutina no extrato seco de folhas de *Azadirachta indica*; C, quercetina padrão; D, quercetina extrato seco de folhas de *Azadirachta indica*.



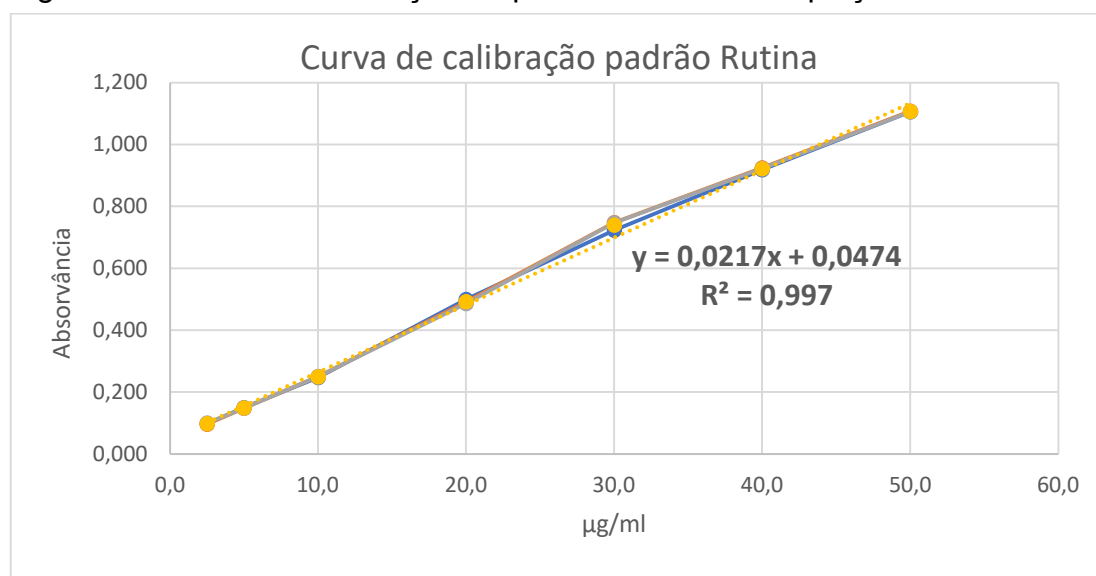
No que se refere à determinação dos teores de flavonoides totais, expressos como rutina, utilizando o método analítico espectrofotométrico, a Tabela 2 apresenta os valores das absorvâncias dos 7 níveis de

concentração, em triplicata, do padrão rutina, utilizados na construção da curva de calibração. A equação da reta e o valor do coeficiente de determinação (R^2) estão apresentados na Figura 10.

Tabela 2 - Valores de absorvância a 364 nm para o padrão rutina nas concentrações de 2,5 a 50 µg/ml

Concentração µg/ml	Absorvância 1	Absorvância 2	Absorvância 3	Média	DP
2,5	0,098	0,096	0,100	0,0980	0,001633
5	0,150	0,148	0,148	0,1487	0,000943
10	0,247	0,250	0,250	0,2490	0,001414
20	0,499	0,491	0,486	0,4920	0,005354
30	0,723	0,748	0,747	0,7393	0,011557
40	0,918	0,924	0,922	0,9213	0,002494
50	1,106	1,108	1,106	1,1067	0,000943

Figura 10 - Curva de calibração do padrão rutina com equação da reta



O teor de flavonoides totais expressos como rutina variou de 2,64 a 3,01% conforme descrito na Tabela 3 e refere-se a diferentes secagens realizadas e cada análise, em triplicata.

Tabela 3 - Absorvâncias a 364 nm das amostras em triplicata provenientes de diferentes secagens e os teores de flavonoides totais expressos como rutina

Secagens	Leituras realizadas a 364 nm			Média	DP	TF
	1 ^a	2 ^a	3 ^a			
Amostra 1	0,386	0,401	0,388	0,391667	0,00665	3,01%
Amostra 2	0,363	0,357	0,403	0,374333	0,020418	2,84%
Amostra 3	0,355	0,34	0,351	0,348667	0,006342	2,64%
Amostra 4	0,368	0,364	0,362	0,364667	0,002494	2,76%

Dp – desvio padrão; TF: teor de flavonoides (%)

A presença dos flavonoides rutina e quercetina nas folhas de *A. indica* foi descrita por Achi *et al.* (2018) e Dorababu *et al.* (2004). A rutina mostrou ser o composto majoritário no nosso trabalho (Figura 6), no entanto, pelo menos outros três compostos não identificados apareceram no cromatograma em quantidades significativas.

O teor de flavonoides totais expressos em rutina de 3,01% foi superior ao observado por outros pesquisadores em extratos brutos de folhas de *A. indica* utilizados em estudos de toxicidade (ACHI *et al.*, 2018; DORABABU *et al.*, 2004). Dorababu *et al.* (2004), empregando cromatografia em camada delgada de alta eficiência, do inglês *High-Performance Thin-Layer Chromatography* (HPTLC) para a quantificação, determinaram os teores de flavonoides totais e de fitoesteroides no extrato aquoso de folhas de *A. indica*, planta coletada na Índia, e obtiveram os valores de 1,25% (rutina 0,41 e quercetina 0,083%) e 0,394%, respectivamente. Embora o método de quantificação seja diferente do empregado em nosso trabalho, os dados apontam possíveis diferenças na composição química dos extratos que podem estar relacionadas a diversos fatores, tais como, ambientais, edáficos, climáticos e geográficos, bem como ao próprio líquido extrator utilizado na obtenção do extrato.

Essas diferenças fitoquímicas são corroboradas por diversos autores. Por exemplo, na triagem fitoquímica foi identificada a presença de alcaloides, saponinas, açúcares redutores, flavonoides e compostos fenólicos (KINGSLEY *et al.*, 2012; OSENI *et al.* 2012), além de taninos (OSENI *et al.* 2012). Esses estudos apontaram ausência de fitoesteroides.

A triagem fitoquímica realizada em Achi *et al.* (2018); Kingsley (2012); Kanagasanthosh; Shanmugapriyan; Kavirajan (2015); Oseni *et al.* (2012) e Soares (2020) apresentou como fator comum a presença de flavonoides e compostos fenólicos. Essas classes de compostos está amplamente presente nas folhas de *A. indica* e ao seu efeito antioxidante é atribuída ação terapêutica anti-inflamatória e anti-hiperglicêmica. Contudo, a triagem fitoquímica possui limitações pois não permite identificar os compostos presentes dentro dos grupos fitoquímicos. Tais limitações dificultam a comparação de resultados dos estudos, pois não permitem identificar os compostos responsáveis pelos efeitos terapêuticos e tóxicos.

Ademais, as diferenças verificadas nas triagens fitoquímicas dos extratos das folhas de *A. indica* sugerem propriedades diferentes. O efeito terapêutico ou tóxico pode ser resultado da sinergia dos compostos dos extratos, de forma que a presença, ausência e a quantidade de um grupo químico pode alterar o perfil de ação do extrato. Nesse sentido, verifica-se no trabalho com extrato etanólico das folhas de *A. indica* utilizando etanol 88% como líquido extrator que os seguintes compostos foram identificados: alcaloides; carboidratos totais (CHO solúvel); compostos fenólicos; esteroides; flavonoides; glicosídeos cianogênicos; saponinas; taninos; terpenoides (ACHI *et al.*, 2018). Diferente desses, os autores Kanagasanthosh; Shanmugapriyan; Kavirajan (2015) não identificaram alcaloides e esteroides na triagem fitoquímica realizada no extrato etanólico 90% e em Oseni *et al.* (2012) não foi identificada a presença de terpenoides, glicosídeos cianogênicos e esteroides no extrato etanólico 95%. A triagem fitoquímica realizada por Soares (2020) nas folhas de *A. indica* (amostra idêntica a utilizada no presente trabalho) confirmou a presença de compostos fenólicos, flavonoides, cumarinas, compostos terpênicos e saponinas. Contudo não foram encontrados alcaloides e taninos.

Destaca-se que mesmo as triagens fitoquímicas, quando realizadas, não contemplam as mesmas classes de compostos, como no caso dos taninos encontrados em Oseni *et al.* (2012) e não investigado em Kingsley *et al.* (2012). Essas lacunas tanto são oportunidades a serem exploradas em outros estudos como demonstram a necessidade de caracterização, identificação e

quantificação dos metabólitos secundários. Tais informações são importantes pois podem contribuir para elucidar efeitos verificados pelos diferentes extratos ou mesmo identificar variações decorrentes do local de origem da planta.

5.3 Validação do método analítico para doseamento de rutina por CLAE-DAD

O doseamento de rutina por CLAE-DAD determinou teores médios de rutina de 1,07% ($\pm 0,062$) e 0,07% ($\pm 0,007$) no extrato seco e no extrato seco microencapsulado de folhas de *A. indica*, respectivamente. O método analítico para o doseamento de rutina foi validado e os resultados são apresentados a seguir.

A adequabilidade do sistema cromatográfico (*system suitability*) foi evidenciada para os parâmetros resolução, fator de retenção, número de pratos teóricos, seletividade e simetria do pico da SQR, conforme demonstrado na Tabela 4. Os valores encontram-se de acordo com o preconizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 1994), demonstrando que o sistema está adequado para a quantificação do marcador rutina nos extratos.

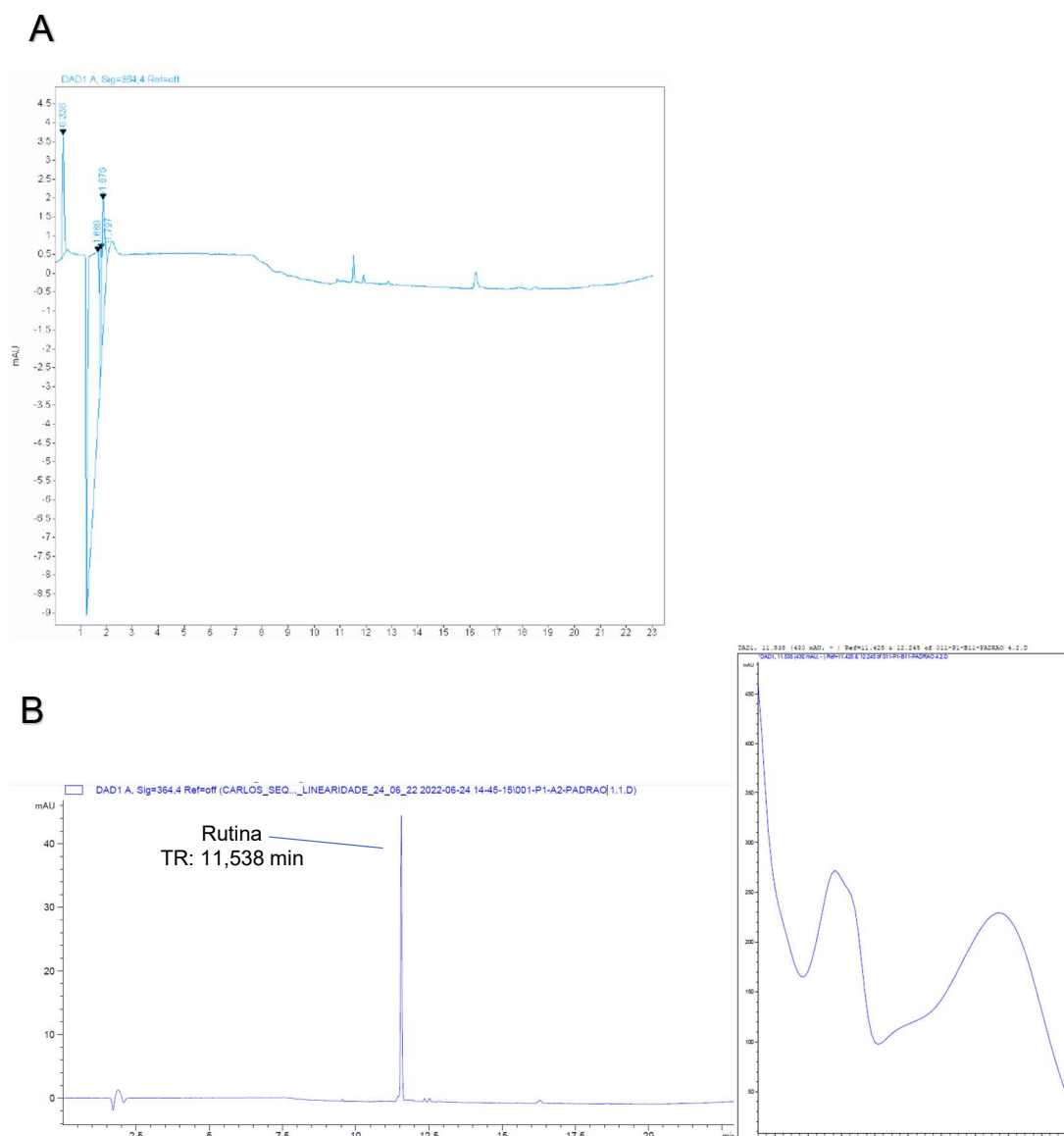
Tabela 4 – Parâmetros de adequabilidade do sistema (*system suitability*) em CLAE-DAD para a determinação de rutina nos extratos secos das folhas de *Azadirachta indica*

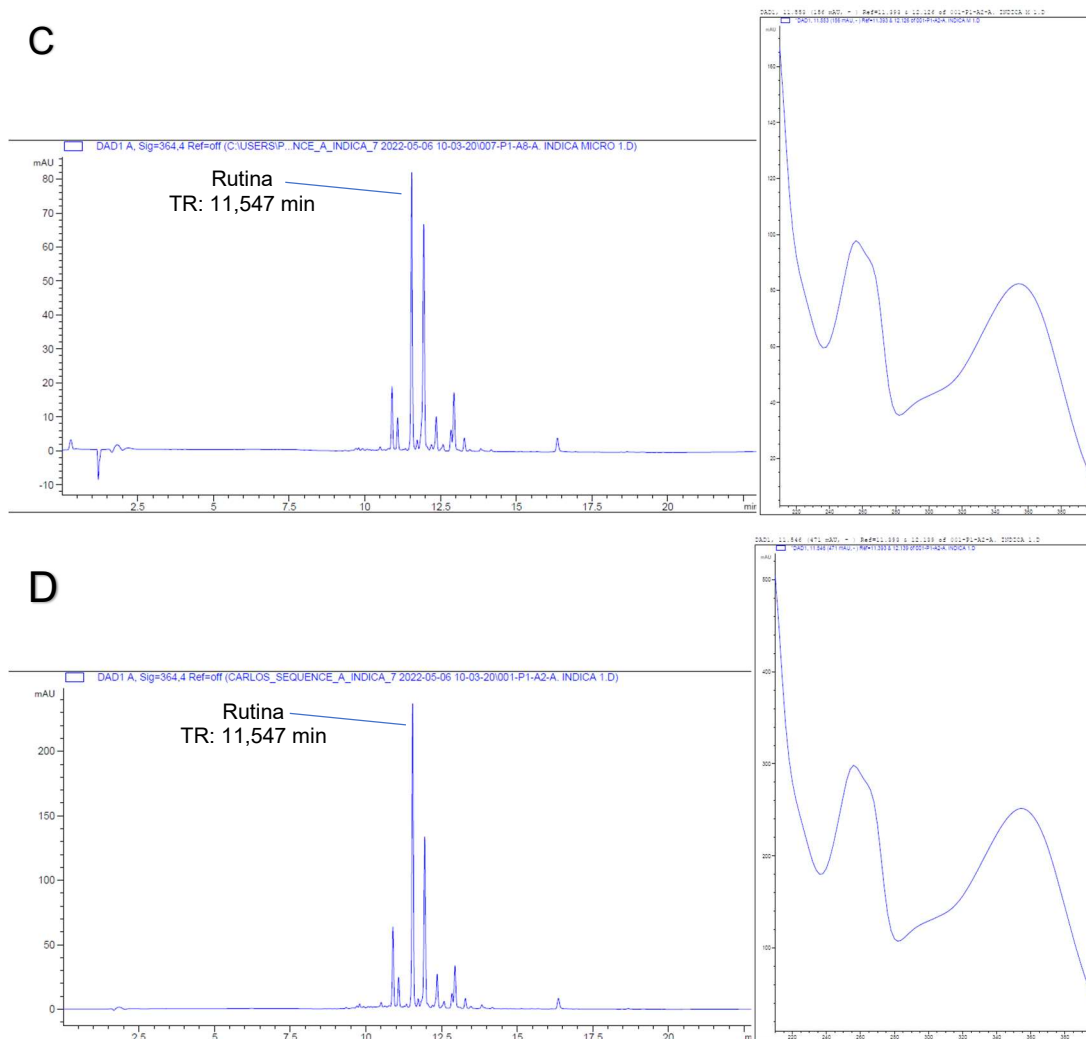
Marcador	Resolução	k	Número de pratos	Seletividade	Simetria
Rutina	2,38	5,26	260590	1,02	0,99
	2,34	5,34	255812	1,02	0,98
	2,36	5,35	255662	1,02	0,99
	2,36	5,36	256405	1,02	0,98
	2,35	5,35	256166	1,02	0,98
	2,35	5,35	257124	1,02	0,98
FDA (1994)	$\geq 2,00$		> 1000	$\approx 1,00$	$\approx 1,00$

Legenda: k fator de retenção refere-se a diferença entre o tempo de retenção do pico de interesse e o tempo de retenção da fase móvel dividido pelo tempo de retenção da fase móvel.

O método demonstrou ser seletivo, primeiramente, pela comparação do tempo de retenção da SQR e do seu pico correspondente no extrato seco microencapsulado e não microencapsulado de folhas de *A. indica* (TR 11, 538 e 11,547 - Figura 11 B, C e D). O segundo critério utilizado para atestar a seletividade foi a comparação dos espectros de absorção na região do U.V. dos picos de rutina na SQR e nas amostras dos extratos (Figura 11 B, C e D). Todos apresentaram dois máximos de absorção, um em 260 nm e outro em 360 nm, demonstrando serem substâncias idênticas.

Figura 11 – Cromatogramas obtidos por CLAE-DAD e espectros de absorção na região do UV. A, solvente utilizado nas amostras (metanol); B, substância química de referência (rutina); C, extrato seco microencapsulado de folhas de *Azadirachta indica*; D, extrato seco de folhas de *Azadirachta indica*

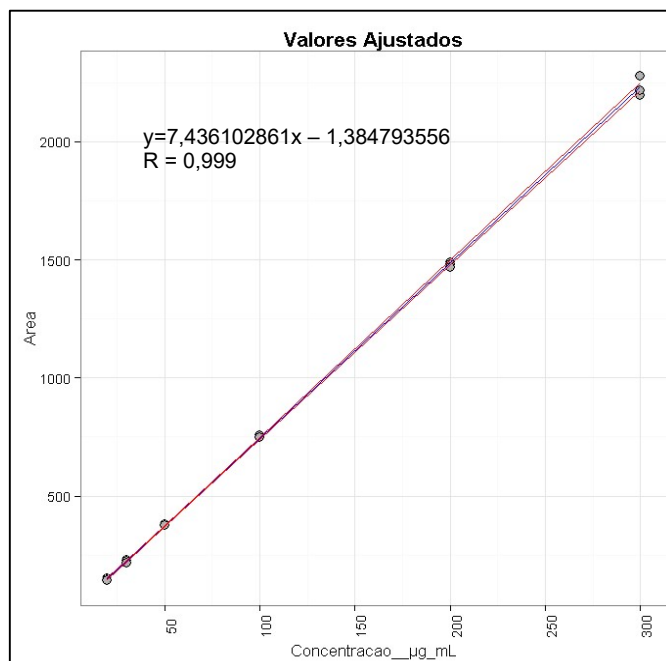




Legenda: Coluna EC-C18 (4,6 x 100mm 2,7 μ m); temperatura de 30 °C; fluxo da fase móvel 1ml/min (gradiente); Espectros na região do UV da rutina, com máximos de absorção próximo a 250 nm e 360 nm em B, C e D; TR=tempo de retenção.

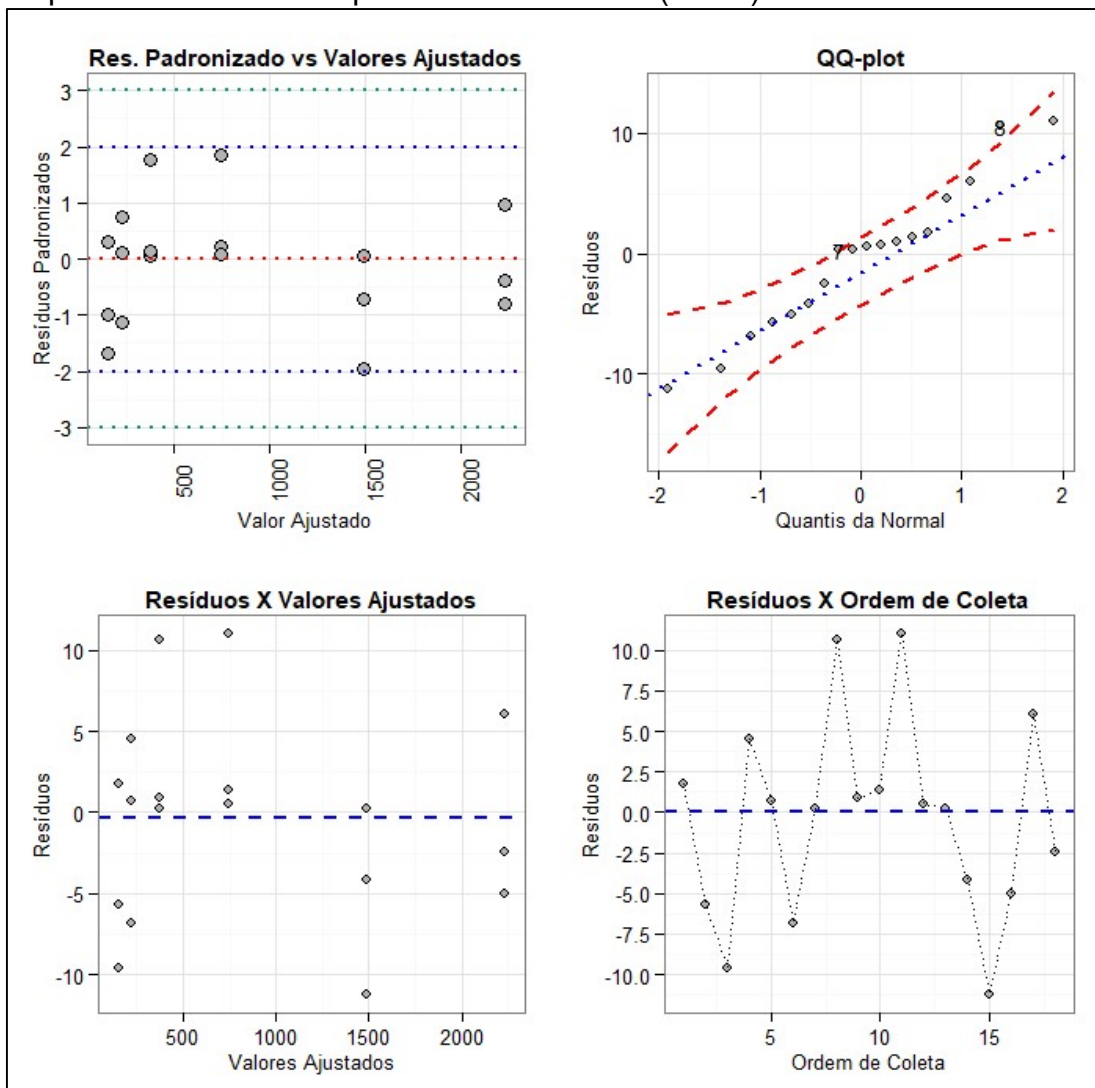
A linearidade do método foi atestada por meio da construção do gráfico concentração *versus* área do pico cromatográfico para seis concentrações da SQR, apresentada na Figura 12. Os dados foram heterocedásticos e a análise de regressão linear originou a equação $y=7,436102861x - 1,384793556$ pelo método dos mínimos quadrados ponderados. O coeficiente de correlação (R) foi de 0,999 sendo o mínimo preconizado pelas agências regulatórias de 0,99. A análise gráfica dos resíduos mostra dispersão dos dados ao redor do valor médio sem grande concentração de valores abaixo ou acima da média conforme se verifica na Figura 13 (BRASIL, 2017).

Figura 12 – Curva de calibração do padrão rotina nas concentrações de 20, 30, 50, 100, 200 e 300 µg/mL para avaliação da linearidade do método



A avaliação visual do gráfico e os resultados da análise estatística demonstram que o método é capaz de gerar respostas diretamente proporcionais à concentração do analito. O valor do intercepto com o eixo y não foi estatisticamente diferente de zero ($p = 0,559382359$) e o coeficiente angular foi estatisticamente diferente de zero ($p = 1,51561 \times 10^{-29}$).

Figura 13 - Gráfico de dispersão dos resíduos da curva concentração x resposta da substância química de referência (rutina)

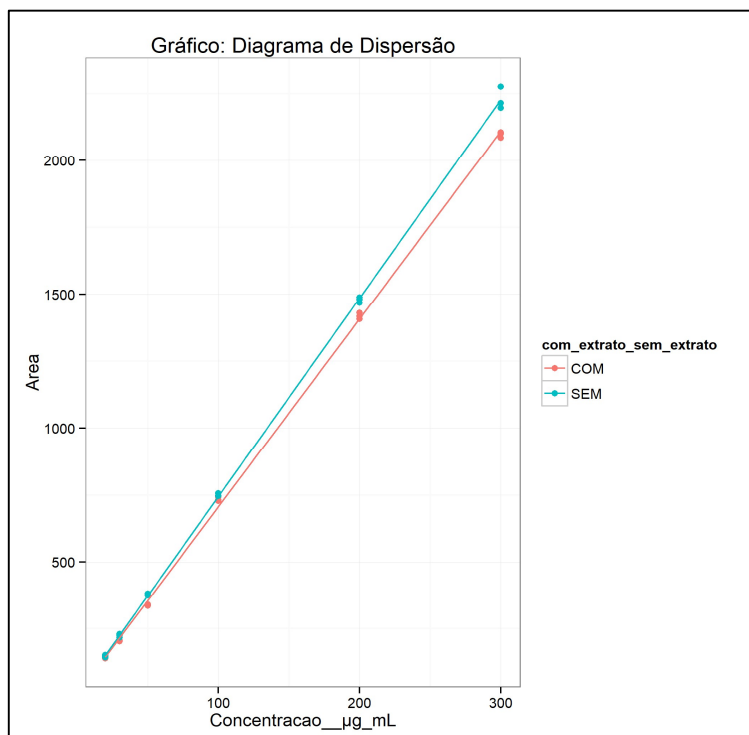


A avaliação do efeito matriz é uma exigência regulamentar quando o método analítico se destina a quantificar componentes em uma matriz complexa (BRASIL, 2017). Os extratos vegetais são matrizes complexas dada a diversidade de compostos neles presentes. Na Figura 14 estão apresentadas as curvas de calibração obtidas com a amostra fortificada com a SQR e apenas a SQR.

A influência ou não da matriz na medida do analito deve ser mensurada por meio da comparação dos coeficientes angulares das curvas construídas com a SQR e a amostra fortificada com a SQR (BRASIL, 2017). Assim, a ausência de efeito matriz é determinada pelo paralelismo e pela coincidência das retas. A ocorrência do efeito matriz para o método analítico ficou

demonstrada pela falta de paralelismo ($p = 3,93381 \cdot 10^{-8}$) e falta de coincidência ($p = 2,7884 \cdot 10^{-11}$) entre as duas retas, para um nível de significância $p < 0,05$.

Figura 14 - Diagrama de dispersão das curvas de calibração da substância química de referência (rutina) e do extrato adicionado de rutina



Os LD e LQ foram estimados à partir dos dados da linearidade com o auxílio de software Action Stat. (versão 3.5), sendo o valor do LD = 7,237794132 µg/mL e o LQ = 21,93270949 µg/mL.

A avaliação da precisão do método, no nível repetibilidade, utilizou seis determinações a 100% da concentração da SQR na amostra. O teste foi realizado tanto no extrato seco microencapsulado como no não microencapsulado e os resultados encontram-se descritos na Tabela 5. O DPR do ES foi de 2,29% inferior o DPR_{ac} de 7,91% demonstrando adequabilidade do método quanto esse critério. Todavia o DPR do ESM de 12,63% foi superior ao DPR_{ac} de 9,33%.

Tabela 5 – Repetibilidade das medidas de concentração, média, desvio padrão relativo (DPR) e desvio padrão aceitável (DPR_{ac}) das seis repetições dos extratos secos microencapsulado (ESM) e não microencapsulado (ES), preparadas a 100% de rutina

Analito	ESM concentração de rutina ($\mu\text{g/mL}$)	ES concentração de rutina ($\mu\text{g/mL}$)
	37,14	105,89
	39,65	107,27
	39,73	106,74
	30,39	112,17
	38,85	106,29
	30,07	109,94
Média	35,97	108,05
DPR (%)	12,63	2,29
DPR_{ac} (%)	9,33	7,91

A precisão intermediária tem como finalidade avaliar o comportamento do método quando são realizadas quantificações por analistas e dias diferentes, utilizando a mesma instrumentação. Para realização desse teste foram feitas seis medidas a 100% da concentração de SQR nas amostras por dois analistas diferentes. A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos na análise da precisão intermediária. O DPR do ES foi de 2,29%, inferior ao DPR_{ac} demonstrando adequabilidade do método quanto a esse critério. Contudo, o DPR para o ESM de 10,67% foi superior ao DPR_{ac} de 9,33%, tal como observado na repetibilidade. As etapas seguintes da validação exatidão e robustez não realizadas para o ESM.

Tabela 6 – Precisão intermediária das medidas de concentração, média, desvio padrão relativo (DPR) e desvio padrão relativo aceitável (DPR_{ac}) das seis repetições dos extratos secos microencapsulado (ESM) e não microencapsulado (ES), preparadas a 100% de rutina

Analito	ESM	ES
	Concentração de rutina (µg/mL)	Concentração de rutina (µg/mL)
1º analista, 1º dia	37,14	105,89
	39,65	107,27
	39,73	106,74
	30,39	112,17
	38,85	106,29
	30,07	109,94
2º analista, 2º dia	34,62	109,10
	39,80	122,53
	39,31	105,03
	35,69	97,61
	36,92	100,91
	30,41	102,50
Média	36,05	107,17
DPR (%)	10,67	5,85
DPR _{ac} (%)	9,33	7,92

A exatidão do método foi avaliada pelo ensaio de recuperação. Na Tabela 7 estão dispostos os valores de recuperação em percentual para os três níveis de concentração avaliados. Os valores de recuperação encontrados ficaram dentro do intervalo aceito para uma concentração de analito de 0,01% que é de 85 – 110% (AOAC INTERNATIONAL, 2019).

Tabela 7 – Percentual de recuperação para os níveis de concentração baixo, média e alta no ensaio de exatidão pelo método de adição de SQR

Analito	Extrato seco	Concentração (µg/mL)	Média	DPR	DPR _{ac}	Recuperação	Recuperação
						% da concentração real	% da concentração teórica
Baixa		46,33	42,06	9,10	9,11	94,94	95,21
		40,93					
		38,93					
Rutina	Média	52,14	50,12	3,89	8,87	96,32	96,59
		48,26					
		49,96					
Alta		59,15	58,30	3,88	8,67	95,64	95,90
		55,74					
		60,02					

Nota : SQR – substância química de referência; DPR_{ac} desvio padrão relativo aceitável pela equação de Horwitz com base na concentração média do analito na amostra.

A robustez do método foi avaliada por meio de pequenas e deliberadas alterações nos seguintes parâmetros: tempo de preparo da amostra (amostra preparada no dia anterior à análise e armazenada a -20 °C por 24 horas e amostra preparada no dia da análise); comprimento de onda (362, 364 e 366 nm); temperatura da coluna (27, 30 e 33 °C). Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 6.

O critério de aceitação para o DPR das medidas de robustez com base na equação de *Horwitz* encontram-se na Tabela 7 . As médias das medidas ficaram próximas do valor teórico e o desvio padrão relativo máximo verificado foi de 4,04% para alteração na condição de armazenagem e menor que 3% nas outras condições. Todos os DPR ficaram inferiores o DPR_{ac} . Dessa forma, fica demonstrada a capacidade do método de medir o analito mesmo quando feitas pequenas alterações nas condições de análise. Assim os dados dão suporte para afirmar que o método atende ao requisito de robustez.

Tabela 8 – Valores de concentração de rutina obtidos após pequenas e deliberadas alterações no método analítico

Parâmetros	Condições	Concentração (µg/mL)	Média	DPR (%)	DPR _{ac} (%)
Armazenamento	Amostra preparada no dia	103,05	100,84	2,00	7,99
		99,09			
		100,37			
	Amostra submetida a armazenamento por 24h a -20 °C	102,72	98,85	4,05	8,01
		94,73			
		99,09			
Ambas condições			99,84	3,04	8,00
Comprimento de onda	362 nm	105,58	103,30	2,01	7,96
		101,51			
		102,82			
	364 nm	103,05	100,84	2,01	7,99
		99,09			
		100,37			
	366 nm	99,41	97,28	2,00	8,03
		95,60			
		96,83			
	362; 364; 366nm			100,47	3,1
Temperatura da coluna	27 °C	103,34	100,54	2,61	7,99
		98,14			
		100,13			
	30 °C	103,05	100,84	2,01	7,99
		99,09			
		100,37			
	33 °C	104,06	102,02	1,75	7,97
		101,26			
		100,74			
	27; 30 e 33°C			101,13	2,00

5.4 Estudo de toxicidade reprodutiva

5.4.1 Avaliação da toxicidade materna do extrato seco das folhas de *Azadirachta indica*

5.4.1.1 Avaliação de sinais clínicos de toxicidade

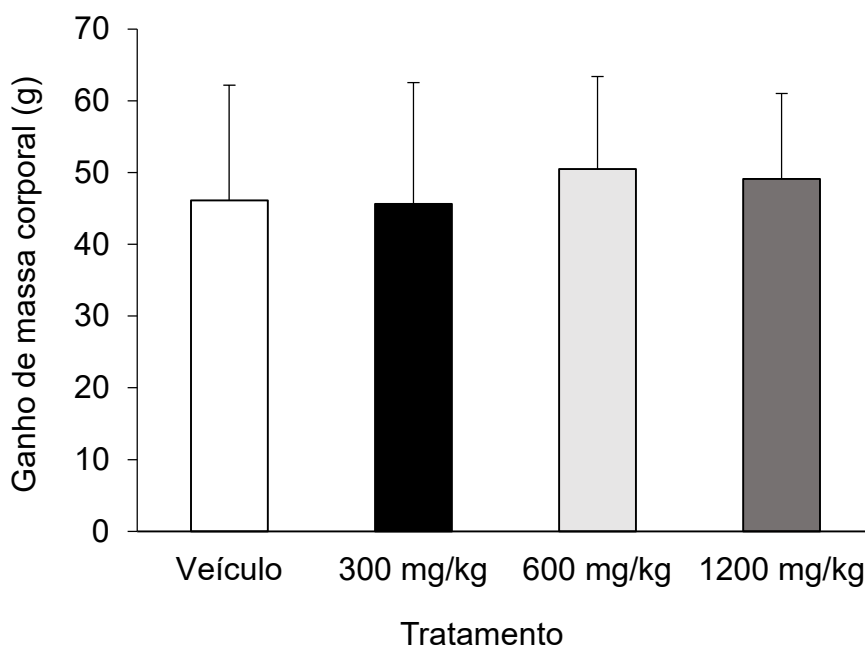
Não foram observados sinais comportamentais e clínicos de toxicidade nas ratas durante todo o período gestacional. Esse resultado corrobora o

descrito em outros estudos de toxicidade aguda (ACHI *et al.*, 2018; TEPONGNIG *et al.*, 2018) e reprodutiva (SILVA *et al.*, 2015) realizados com extratos das folhas de *A. indica*.

5.4.1.2 Avaliação do ganho de massa corporal, consumo de ração e água

As Figura 15, 16 e 17 mostram, respectivamente, o ganho de massa corporal, o consumo de ração e água de ratas que receberam tratamento com o veículo ou extrato seco das folhas de *A. indica* durante a gestação. O tratamento com extrato seco das folhas de *A. indica* não alterou o ganho de massa corporal das progenitoras [$F_{(3,36)} = 1,02$; $p = 0,39$].

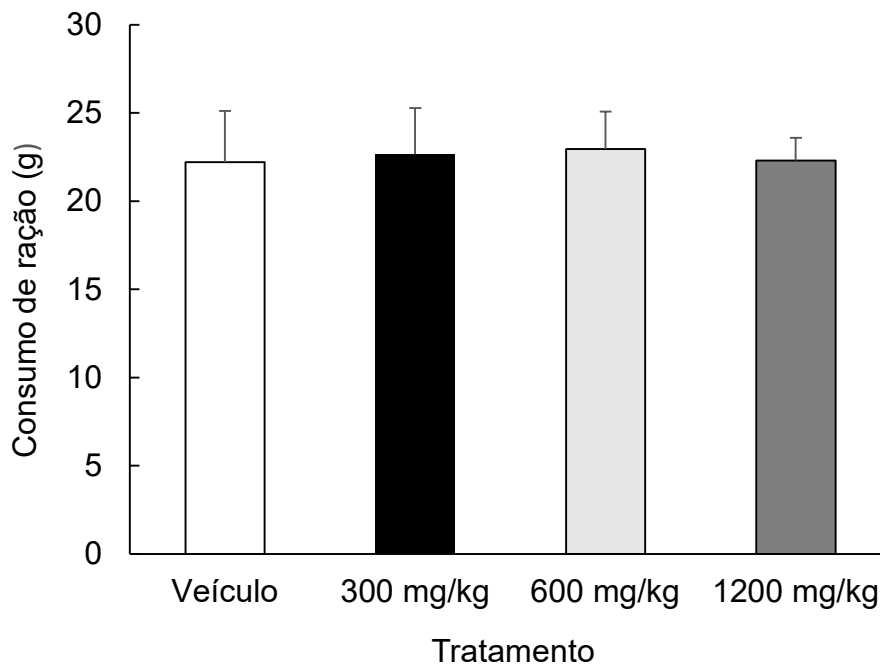
Figura 15 - Ganho de massa corporal (g) de ratas *Wistar* (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação



Nota – As barras representam a média \pm desvio padrão da média. ANOVA unifatorial.

A Figura 16 ilustra o consumo de ração das ratas que receberam tratamento com o veículo ou extrato seco das folhas de *A. indica* durante a gestação. O tratamento com extrato seco de *A. indica* não influenciou no consumo de ração pelas ratas durante a gestação [$F_{(3,36)} = 0,16$; $p = 0,92$].

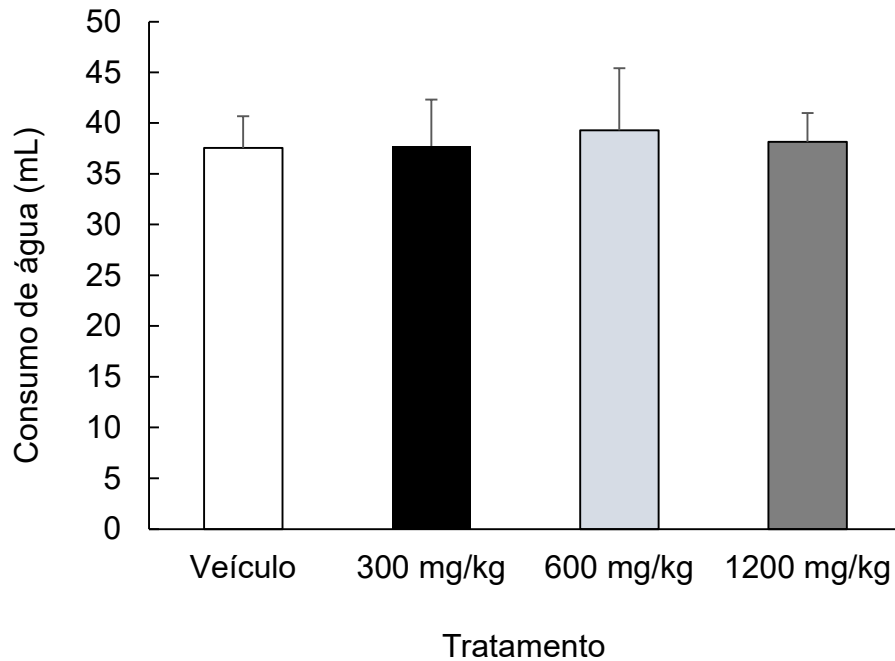
Figura 16 - Média do consumo de ração (g) de ratas *Wistar* (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação



Nota – As barras representam a média \pm desvio padrão da média. ANOVA unifatorial.

A média do consumo de água das ratas tratadas com o veículo ou extrato seco das folhas de *A. indica* está ilustrada na Figura 17. O tratamento com diferentes doses do extrato não alterou o consumo de água entre os grupos [$F_{(3,36)} = 0,43$; $p=0,73$].

Figura 17 - Média do consumo de água (mL) de ratas Wistar (n= 10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação



Nota – As barras representam a média ± desvio padrão da média. ANOVA unifatorial.

5.4.1.3 Avaliação dos parâmetros de desempenho reprodutivo materno

Os parâmetros de desempenho reprodutivo de ratas tratadas com o veículo ou extrato seco das folhas de *A. indica* estão apresentados na Tabela 9. Não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação aos parâmetros analisados.

Tabela 9 - Parâmetros de desempenho reprodutivo de ratas *Wistar* (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou com o extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação.

Parâmetros	Extrato seco de <i>A. indica</i> (mg/kg)				F _(3,36)	P
	Veículo	300	600	1200		
Índice de prenhez	90%	100%	100%	100%	-	-
Número de ninhadas	10	10	10	10	-	-
Número total de fetos	11,40 ± 1,35	11,30 ± 2,50	11,70 ± 1,57	12,50 ± 1,51	0,92	0,44
Número de fetos vivos (FV)	10,90 ± 1,6	10,70 ± 3,09	11,20 ± 1,69	11,70 ± 1,77	0,42	0,74
Número de fetos mortos	0,5 ± 1,27	0,60 ± 1,07	0,50 ± 0,71	0,80 ± 1,23	0,17	0,92
Número de sítios de implantação (SI)	11,60 ± 1,26	11,30 ± 2,50	11,80 ± 1,69	12,60 ± 1,58	0,94	0,43
Número de reabsorções pré-implantação	0,40 ± 0,97	1,00 ± 1,89	1,40 ± 3,10	0,00	1,1	0,36
Número de reabsorções pós-implantação	0,30 ± 0,67	0,20 ± 0,42	0,10 ± 0,32	0,10 ± 0,32	0,44	0,72
Número de corpos lúteos (CL)	12,70 ± 1,95	12,90 ± 1,37	13,30 ± 3,86	12,70 ± 1,57	0,14	0,94
Perda pré-implantação (%)	0,08 ± 0,07	0,13 ± 0,16	0,08 ± 0,13	0,01 ± 0,02	1,56	0,21
Perda pós-implantação (%)	0,06 ± 0,11	0,07 ± 0,16	0,05 ± 0,07	0,07 ± 0,10	0,09	0,96
Peso dos fetos (g)	4,85 ± 0,48	4,74 ± 0,50	4,83 ± 0,43	4,82 ± 0,45	0,1	0,96
Peso da placenta (g)	0,48 ± 0,05	0,46 ± 0,05	0,48 ± 0,05	0,46 ± 0,06	0,27	0,84

Notas - Os valores estão expressos em média ± desvio padrão da média. Anova unifatorial. Perda pré-implantação = (CL-SI/CL*100). Perda pós-implantação = (SI-FV/SI*100).

5.4.1.4 Massa dos órgãos

A massa absoluta e a massa relativa do fígado, coração, rins e pulmões de ratas tratadas com o veículo ou extrato seco das folhas de *A. indica* estão apresentadas nas Tabelas 10 e 11. Não foi observada diferença significativa em relação a massa absoluta dos órgãos. Apenas foi observada diferença significativa em relação a massa relativa dos rins [$F_{(3,36)} = 3,45$; $p=0,026$]. De

acordo com o *test post hoc* de Newman-Keuls, houve redução da massa relativa dos rins das fêmeas tratadas com a dose de 1200 mg/kg do extrato seco de *A. indica* quando comparadas às fêmeas que receberam as doses de 300 e 600 mg/kg ($p < 0,05$).

Tabela 10 – Massa (g) dos órgãos em valores absolutos de ratas Wistar (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou com o extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação

Parâmetros	Extrato seco de <i>Azadirachta indica</i> (mg/kg)				F	P
	Veículo	300	600	1200		
Fígado	11,07 ± 1,05	11,64 ± 1,08	11,63 ± 0,94	11,98 ± 0,64	1,59	0,21
Rins	1,67 ± 0,10	1,71 ± 0,10	1,76 ± 0,18	1,62 ± 0,13	1,77	0,17
Coração	0,78 ± 0,09	0,82 ± 0,10	0,85 ± 0,12	0,79 ± 0,08	0,96	0,42
Pulmão	1,30 ± 0,22	1,15 ± 0,14	1,25 ± 0,12	1,25 ± 0,17	1,33	0,28

Nota - Os valores estão expressos em média ± desvio padrão da média. Anova unifatorial.

Tabela 11 – Massa (g) relativa dos órgãos calculada como massa do órgão/(massa corporal x 0,001) de ratas Wistar (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou com o extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação.

Parâmetros	Extrato seco de <i>A. indica</i> (mg/kg)				F	P
	Veículo	300	600	1200		
Fígado	36,97 ± 2,69	39,48 ± 2,29	38,11 ± 1,37	39,09 ± 3,43	1,92	0,14
Rins	5,59 ± 0,29	5,81 ± 0,53	5,76 ± 0,47	5,28 ± 0,28 ^{bc}	3,44	0,03
Coração	2,61 ± 0,25	2,76 ± 0,19	2,78 ± 0,29	2,58 ± 0,21	1,88	0,15
Pulmão	4,30 ± 0,47	3,90 ± 0,42	4,11 ± 0,51	4,06 ± 0,07	1,14	0,34

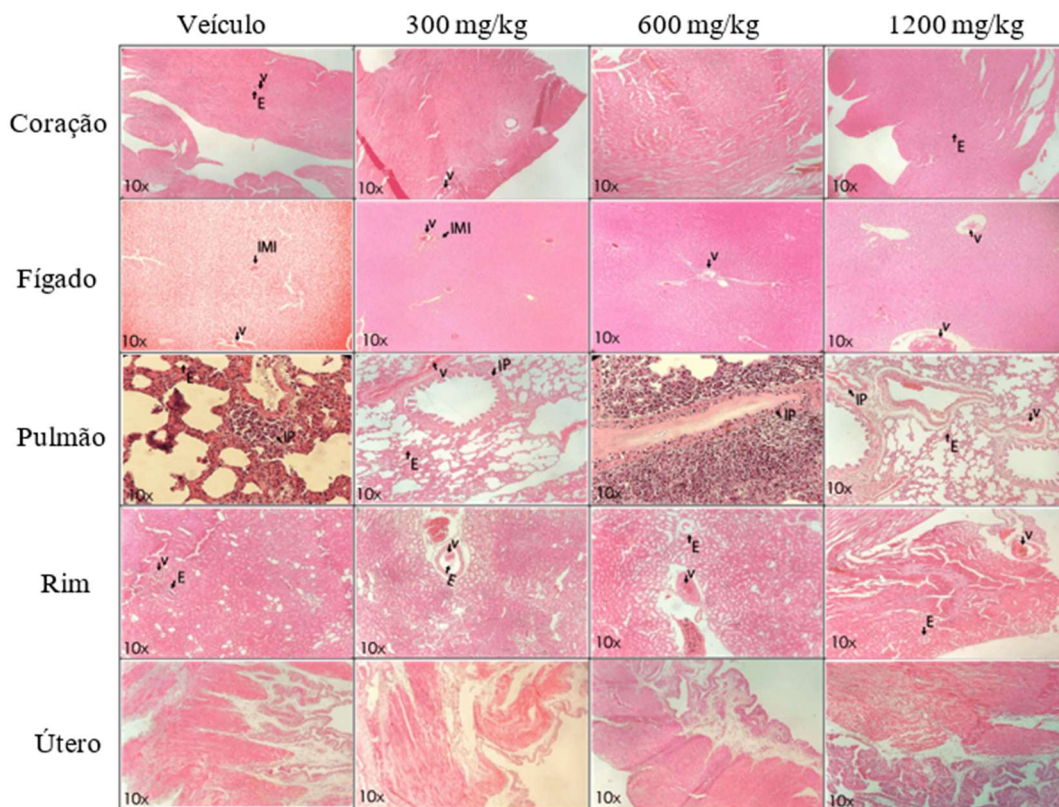
Nota - Os valores estão expressos em média ± desvio padrão da média. Anova unifatorial. (b) representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo grupo 300 mg/kg (c) representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo 600 mg/kg.

5.4.1.5 Análise histopatológica

Os resultados da análise histológica de ratas tratadas com o veículo ou extrato seco das folhas de *A. indica* estão apresentados na Tabela 12. Na análise semi-quantitativa realizada, não foi evidenciada maior incidência de alterações histológicas nos tratamentos em relação ao controle, exceto para

colapso do parênquima e pigmento antracótico no pulmão. As alterações encontradas não sugerem toxicidade do extrato e estão ilustradas na Figura 18.

Figura 18 – Cortes histológicos dos tecido cardíaco, hepático, pulmonar, renal e uterino de ratas Wistar (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou com o extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação.



Nota: Método de coloração: hematoxilina e eosina. Vasoconstrição (V); infiltrado mononuclear intraparênquimatoso (IMI); edema (E); infiltrado perivascular (IP).

Tabela 12 – Porcentagem de achados histológicos e alterações teciduais observados nos tecidos cardíaco, hepático, pulmonar, renal e uterino de ratas Wistar (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou com o extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação.

Tratamento	Veículo (controle)	Extrato seco de <i>A. indica</i> (mg/kg)		
		300	600	1200
Ratos examinados (n)	10	10	10	10
Órgãos com anormalidades (%):				
Coração				
Edema	90%	100%	100%	100%
Vasoconstrição	90%	100%	100%	100%
Fígado				
Edema	100%	100%	100%	100%
Vasoconstrição	100%	100%	100%	100%
Agrupamentos linfo-histiocitário intra parênquima	40%	20%	20%	20%
Pulmão				
Edema	100%	100%	100%	90%
Vasoconstrição	100%	100%	100%	90%
Espessamento do septo interlobular	100%	100%	100%	80%
Infiltrado inflamatório	60%	40%	40%	40%
Pigmento antracótico	20%	50%	20%	30%
Células mononucleares no lúmen alveolar	0%	10%	10%	0%
Colapso do parênquima	20%	30%	10%	0%
Rins				
Edema	100%	100%	100%	100%
Vasoconstrição	100%	100%	100%	100%
Túbulos e lúmens dilatados raros com focos de calcificação	0%	0%	10%	0%
Útero				
Útero puerperal	100%	100%	100%	100%

5.4.1.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos maternos

Os parâmetros bioquímicos de ratas tratadas com o veículo ou extrato seco das folhas de *A. indica* estão apresentados na Tabela 13. Não foi observada diferença significativa entre os grupos em relação aos parâmetros analisados.

Tabela 13 – Paramêntros bioquímicos de ratas Wistar (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou extrato seco de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante o período gestacional.

Parâmetros	Extrato seco de <i>Azadirachta indica</i> (mg/kg)				F _(3,32)	P
	Veículo	300	600	1200		
Creatinina (mg/dL)	0,41 ± 0,11	0,40 ± 0,07	0,38 ± 0,12	0,5 ± 0,12	2,28	0,10
Ureia (mg/dL)	29 ± 5,32	29,22 ± 5,89	26,67 ± 6,16	32,33 ± 3,81	1,69	0,19
TGO (U/L)	48,33 ± 11,70	53,78 ± 24,90	46,67 ± 20,78	59,78 ± 37,30	0,49	0,69
TGP (U/L)	25,00 ± 8,08	19,22 ± 8,58	21,11 ± 9,16	25,00 ± 8,38	1,03	0,39
Fosfatase alcalina (U/L)	141,34 ± 64,36	130,00 ± 52,29	122,81 ± 45,44	144,40 ± 74,29	0,25	0,86
Proteínas totais (g/dL)	3,42 ± 0,80	3,67 ± 1,01	3,06 ± 1,19	3,56 ± 0,91	0,65	0,59
Albumina (g/dL)	1,52 ± 0,42	1,61 ± 0,42	1,32 ± 0,49	1,51 ± 0,41	0,70	0,56

Nota - Os valores estão expressos em média ± desvio padrão da média. Anova unifatorial

Em conjunto, os resultados deste estudo mostraram que o tratamento com o extrato seco das folhas de *A. indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante a gestação não induziu toxicidade materna, pois não houve alteração no ganho de massa corporal, consumo de ração e água. Além disso, não foram observadas alterações nos parâmetros bioquímicos que avaliam toxicidade hepática e renal, assim como, achados histopatológicos nos tecidos nesses tecidos.

Na interpretação dos dados de toxicidade materna os níveis de toxicidade são avaliados segundo critérios gerais (sinais clínicos adversos, redução do consumo de alimentos e da massa corporal) e específicos (alterações macroscópicas de órgãos e histopatológicas) (TYL, 2012). Além desses critérios costuma-se somar a avaliação dos parâmetros bioquímicos de função renal e hepática. Esses critérios devem ser analisados de forma conjunta considerando a existência de relação dose resposta ou outro fator que explique o efeito (TYL, 2012).

Em outros estudos, como o de Silva *et al.* (2015), o extrato etanólico de folhas de *A. indica* nas doses de 65, 135 e 200 mg/kg administrado no quarto, quinto e sexto dia da gestação por via oral também não induziu toxicidade

materna e reprodutiva em ratas em estudo de desenvolvimento pós-natal (SILVA *et al.*, 2015). Nesse estudo a ausência de toxicidade materna se baseou nos critérios gerais, pois pelo próprio desenho experimental não seria possível realizar a avaliação dos órgãos internos. Tais resultados estão de acordo com os dados por nós encontrados e indicam baixa toxicidade materna dos extratos das folhas de *A. indica*.

Quanto aos parâmetros bioquímicos, a ureia (TEPONGNING *et al.*, 2018; AKINOLA *et al.*, 2011) e creatinina (AKINOLA *et al.*, 2011; DORABABU *et al.*, 2006; TEPONGNING *et al.*, 2018) foram utilizadas como indicadores da função renal. A ureia é excretada 90% pelos rins por filtração, sem ação de processos ativos de secreção e reabsorção. Contudo, é um preditor fraco da função renal pois 40 a 70% retorna ao plasma por difusão passiva (DUSSE *et al.*, 2017). A dieta alimentar, a desidratação, taxa de produção hepática, trauma, infecção e alguns fármacos podem interferir na sua concentração sem que tenha relação com a função renal. Embora tenha limitações, as concentrações plasmáticas de ureia se alteram mais precocemente quando comparado com a creatinina (DUSSE *et al.*, 2017). Essa última é originada do metabolismo muscular e da ingestão de carne, sendo um produto residual da creatina. Tem sua liberação pelo músculo realizada de forma praticamente constante mas sua geração é proporcional a massa muscular, que varia de acordo com a idade, sexo e etnia. Da mesma forma que a ureia, tem limitações, pois os valores considerados acima do normal só ocorrem a partir de diminuição da ordem de 50 a 60% da taxa de filtração glomerular (DUSSE *et al.*, 2017).

Por todos esses aspectos a ureia e a creatinina são uteis na avaliação de toxicidade renal mas possuem reduzido valor preditivo isoladamente. Por isso, a avaliação de toxicidade materna leva em consideração outros aspectos como a massa absoluta e relativa dos órgãos e a análise histopatológica (PLAA; CHARBONNEAU; PLANTE, 2014; TYL, 2012). O extrato etanólico das folhas de *A. indica* na dose de 500 mg/kg por 50 dias (AKINOLA *et al.*, 2011) 100, 200 e 300mg/kg por 48 dias (SERIANA *et al.*, 2021), aquoso das folhas de *A. indica* na dose de 1000 mg/kg (DORABABU *et al.*, 2006) e hidroetanólico na dose de 75, 150 e 300 mg/kg (TEPONGNING *et al.*, 2018) não

promoveram alteração de úreia e creatinina em ratos em 28 dias de tratamento.

Na função hepática foram quantificados TGO, TGP (DORABABU *et al.*, 2006; SERIANA *et al.*, 2021; TEPONGNING *et al.*, 2018) proteínas totais e albumina (DORABABU *et al.*, 2006). Os referidos marcadores não apresentaram diferença significativa quando comparados ao controle, exceto pelo aumento na TGO na dose de 300 mg/kg (TEPONGNING *et al.*, 2018) e uma tendência de aumento de TGO no grupo tratado com 1000 mg/kg em Dorababu *et al.* (2006). Esses marcadores quando elevados podem ser indicativos de injúria hepática. A elevação de TGO sem elevação de TGP pode ser indicativo de lesão extra hepática nos músculos esquelético, diafragma ou músculo cardíaco (PLAA; CHARBONNEAU; PLANTE, 2014). Ambas as enzimas estão presentes no fígado, porém mais de 90% da TGP está localizada no fígado, principalmente dos mamíferos de pequena massa corporal, como os usados nos ensaios pré clínicos (PLAA; CHARBONNEAU; PLANTE, 2014). Logo em várias situações de injúria hepática a TGP encontra-se elevada. Todavia a concentração sérica da TGP pode não estar aumentada em pacientes com doença hepática confirmada por exame histopatológico como: cirrose, esteato hepatite não alcoólica ou hepatite C (YANG *et al.*, 2008). Nesse sentido, a análise da hepatotoxicidade é incompleta quando não contempla avaliação histológica (PLAA; CHARBONNEAU; PLANTE, 2014).

A análise histopatológica em nosso estudo não mostrou alterações importantes na histologia dos órgãos e nem a maior porcentagem nos tratamentos em relação ao controle. Outros trabalhos mediram as massas dos órgãos fígado, rins (DORABABU *et al.*, 2006; TEPONGNING *et al.*, 2018), coração, pulmão e baço (TEPONGNING *et al.*, 2018). Dessa análise foi observado um aumento de massa do fígado e rins, contudo a histologia desses órgãos não demonstrou alteração entre o grupo tratado com extrato e o controle (DORABABU, 2006). As alterações relativas de massa dos órgãos podem indicar toxicidade, mas sua correlação com a ocorrência e severidade do dano hepático é baixa (PLAA; CHARBONNEAU; PLANTE, 2014). A ocorrência de alteração de massa relativa ou absoluta sem evidência de danos histopatológico ou funcional é de pouca importância toxicológica.

5.4.1.7 Morfologia externa e medidas morfométricas fetais

Na avaliação da morfologia externa e das medidas morfométricas de fetos de ratas tratadas com o veículo ou extrato seco das folhas de *A. indica* não foi observada diferença significativa entre os grupos (Tabela 14). Embora não tenha sido estatisticamente significativo, na análise de malformações externas foi observada exencefalia, macroglossia e medula espinhal ausente em um feto tratado com a dose de 600 mg/kg do extrato seco das folhas de *A. indica* (Figura 19). A exencefalia é caracterizada pela protusão do cérebro para fora do crânio devido a ausência total ou parcial dos ossos que formam a calota craniana. A macroglossia é a protusão da língua para fora da boca devido ao seu comprimento maior que o normal (MACRIS, 2009). Ambas malformações fetais foram encontradas por Dallaqua *et al.* (2013) em estudos com o óleo da semente de *A. indica* na dose de 1,2 mL/dia, sendo 7 fetos com exencefalia dentre 117 fetos analisados no grupo tratado contra nenhum feto com malformação no grupo controle. Nesse mesmo estudo foi testado o efeito da azadiractina (1 mg/mL/dia), substância presente no óleo da semente de *A. indica* e utilizada como inseticida, contudo não foi encontrada qualquer malformação fetal, embora tenha aumentado o número de anormalidades (DALLAQUA *et al.*, 2013). O autor se refere a anormalidades como sendo uma variação transitória e não prejudicial à sobrevivência do feto enquanto a malformação é uma deficiência do desenvolvimento com capacidade de prejudicar a saúde do feto de forma permanente com risco de morte (DALLAQUA *et al.*, 2013).

Tabela 14 - Medidas morfométricas (mm) de fetos de ratas Wistar (n=10/grupo) tratadas, via oral, com o veículo ou extrato seco de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante o período gestacional.

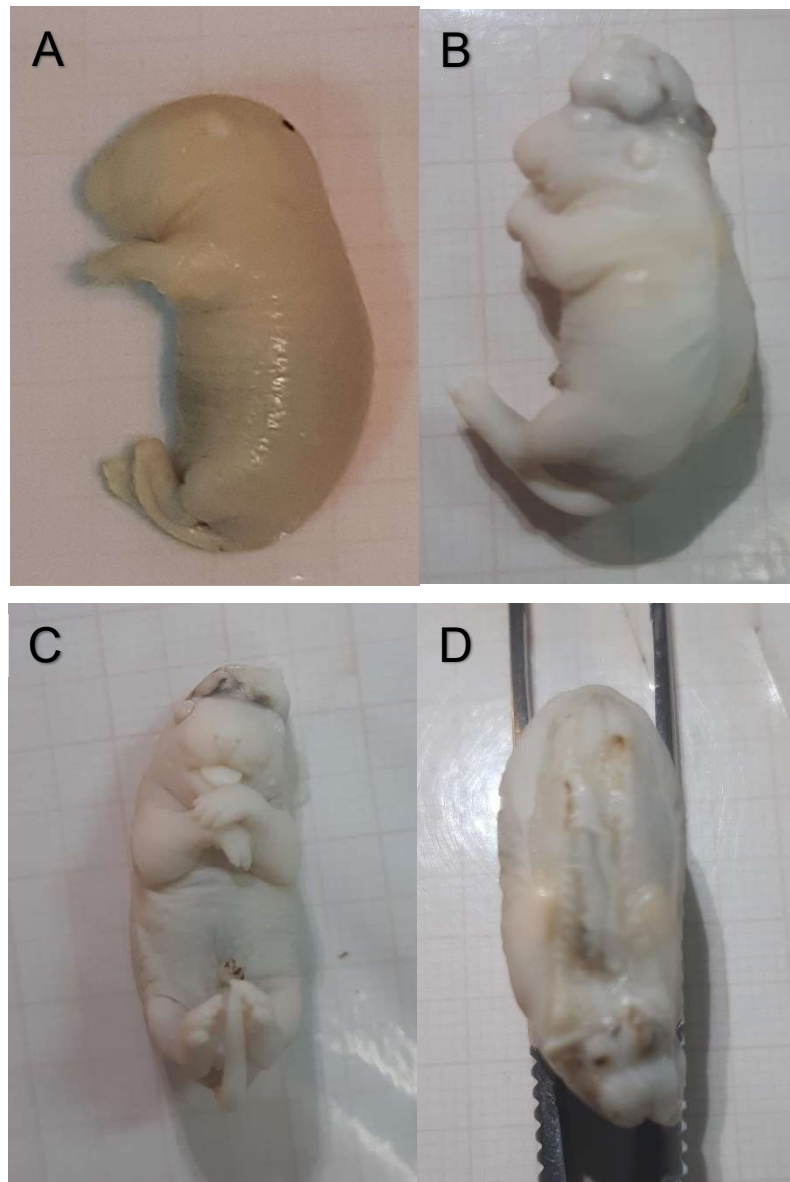
Medidas morfométricas	Veículo	Extrato seco de <i>A. indica</i> (mg/kg)			F _(3,36)	P
		300	600	1200		
Número de ninhadas	10	10	10	10	-	-
Ântero posterior do crânio	15,20 ± 0,87	15,05 ± 0,67	14,92 ± 0,47	14,99 ± 0,61	0,31	0,82
Látero lateral do crânio	9,82 ± 0,49	9,76 ± 0,33	9,82 ± 0,41	9,89 ± 0,43	0,16	0,92
Ântero posterior do tórax	13,48 ± 0,97	13,08 ± 1,22	13,10 ± 1,00	13,33 ± 1,23	0,30	0,82
Látero lateral do tórax	12,65 ± 1,00	12,59 ± 1,35	12,36 ± 1,01	12,59 ± 1,33	0,11	0,95
Crânio-caudal	40,17 ± 1,35	39,50 ± 1,47	40,00 ± 0,99	39,20 ± 1,50	1,11	0,35
Cauda	14,55 ± 0,64	14,34 ± 0,76	14,57 ± 0,68	14,30 ± 0,67	0,43	0,73

Nota – Os valores estão expressos em média ± desvio padrão da média.

A exencefalia é uma malformação extremamente incomum, especialmente quando ocorre na ausência de toxicidade materna (KHERA, 1987). Essa malformação tem causa genética, mas também esta relacionada a uso de agentes químicos (AVAGLIANO, 2019). Quando a exencefalia está associada a exposição da medula espinhal a ocorrência é mais rara e chamada de cranioraquisquise (MACKIS, 2009). Dessa forma, a ocorrência de exencefalia com extratos da planta pode ser indicativo da presença de composto teratogênico também no extrato das folhas *A. indica*.

A ausência de significância estatística para eventos de ocorrência pouco frequente e sem relação dose resposta positiva diminuem a força da evidência quanto ao risco associado, mas não eliminam a preocupação (EMA, 2020). Nesses casos, faz-se necessário avaliar outros estudos de toxicidade fetal utilizando a/as substâncias químicas suspeitas. A avaliação de risco, por ser um processo contínuo, depende do maior número de informações disponíveis a respeito do comportamento do teratogênio, farmacocinética, farmacodinâmica, dose resposta (EMA, 2020). Por isso, a identificação e o doseamento dos outros fitoquímicos presentes nas amostras, tanto do extrato da semente como das folhas da *A. indica*, podem ajudar a identificar um possível teratogênio.

Figura 19 – Fotos dos fetos recém-nascidos: (A) feto normal; (B) exencefalia; (C) macroglossia; (D) cranioraquisquise



Fonte: Próprio autor

5.4.1.8 Análise esquelética

A análise esquelética de fetos de ratas tratadas com o veículo ou extrato seco das folhas de *A. indica* estão apresentados nas Tabelas 15 e 16. Foi observado aumento da de sítios de ossificação supranumerário no esterno nos fetos do grupo 1200 mg/kg em relação aos dos grupos 300 mg/kg e veículo (Tabela 15).

Observou-se no grupo tratado com a dose de 1200 mg/kg que entre os dez fetos com sete esternébrios dois deles apresentaram costelas rudimentares ou brotos. Nos grupos tratados com 300 mg/kg um feto apresentou sete esternébrios enquanto no grupo 600 mg/kg dois fetos apresentaram a anomalia. No grupo veículo não foi observada a presença de sete esternébrios. A ocorrência de sete esternébrios pode ser observada na Figura 20.

Tabela 15 – Alterações/malformações no esqueleto axial de fetos de ratas *Wistar* tratadas, via oral, com o veículo ou extrato seco de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg durante o período gestacional

Parâmetros	Extrato seco de <i>Azadirachta indica</i> (mg/kg)			
	Veículo	300	600	1200
Ninhadas	10	10	10	10
Fetos	56	56	58	63
Ossos da costela				
<i>Costelas rudimentares ou brotos</i>	0	1 (1,78)	3 (5,17)	3 (4,76)
<i>Ossificação incompleta do esterno</i>	5 (8,92)	4 (7,14)	5 (8,62)	5 (7,94)
<i>Ausência de um esternébrio</i>	1 (1,78)	0	1 (1,72)	0
<i>Sítio de ossificação supranumerário no esterno</i>	0	1 (1,78)	2 (3,44)	10 (15,87) ^{ab}
<i>Esternébrio em formato de halteres</i>	0	0	0	1 (1,59)

Nota: entre parênteses estão os valores das porcentagens relativas de fetos afetados (total de fetos afetados/total de fetos analisados por grupo) x 100. Fora dos parênteses estão os valores absolutos. O teste qui quadrado mostrou diferença significativa entre as frequências nos grupos ($p < 0,05$). Para verificação da diferença entre grupos foi utilizada a correção de Bonferroni sendo significativo um $p < 0,0083$. (a) representa diferença em relação ao grupo veículo, $p = 0,001839$; (b) diferença em relação ao grupo 300 mg/kg, $p = 0,008092$.

Tabela 16 – Alterações no esqueleto apendicular de fetos de ratas *Wistar* tratadas durante a gestação, via oral, com o veículo ou extrato seco de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg

Parâmetros	Extrato seco de <i>A. indica</i> (mg/kg)			
	Veículo	300	600	1200
Ninhadas	10	10	10	10
Fetos	56	56	58	63
Metacarpos				
8 sítios de ossificação	48(85,71)	46(82,14)	54(93,10)	57(90,48)
≤ 7 sítios de ossificação	8(14,29)	10(17,86)	4(6,90)	6(9,52)
Falanges anteriores				
8 sítios de ossificação	34(60,71)	34(60,71)	43(74,14)	41(65,08)
≤ 7 sítios de ossificação	21(37,50)	22(39,29)	14(24,14)	22(34,92)
Ausência	1(1,79)	-	-	-
Metatarsos				
10 sítios de ossificação	35(62,50)	30(53,57)	29(50,00)	36(57,14)
≤ 9 sítios de ossificação	21(37,50)	26(46,43)	29(50)	28(44,44)
Falanges posteriores				
8 sítios de ossificação	2(3,57)	4(7,14)	2(3,45)	4(6,35)
≤ 7 sítios de ossificação	16(28,57)	20(35,71)	20(34,48)	17(26,98)
Ausência	39(69,64)	28(50,00)	36(62,07)	42(66,67)

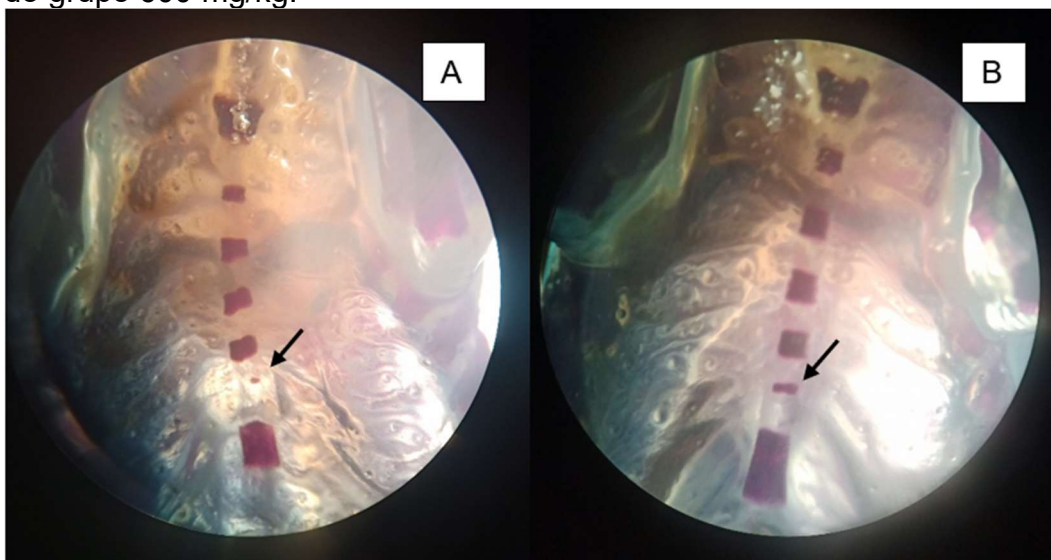
Nota: entre parênteses estão os valores das porcentagens relativas de fetos afetados (total de fetos afetados/total de fetos analisados por grupo) x 100. Fora dos parênteses estão os valores absolutos. O teste qui quadrado não mostrou diferença significativa entre os grupos.

O desenvolvimento fetal do esterno inicia a partir de duas faixas amplamente separadas, uma de cada lado da parede dorsolateral do corpo, e ventralmente definida a partir das costelas. As células mesodérmicas somáticas alongam-se na direção caudal e em direção a linha média com o crescimento descendente dos tecidos ao longo da parede dorso-lateral do corpo. As faixas funde-se anteriormente ao nível da primeira costela esternal do rato e, em seguida, a fusão prossegue posteriormente, de modo que, no 18º dia de gestação, resulta em uma única barra de cartilagem (KHERA,

1981). As costelas entram em contato com o esterno. No 20º dia começa a hipertrofia na cartilagem esternal, que subdivide o esterno em esternébrio. A hipertrofia é seguida pela ossificação que ocorre em seis centros dispostos linearmente. Assim, ao nascer, o esterno exibe seis segmentos bem ossificados interconectados por bandas de cartilagem nos locais de futuras articulações esternocostais. Esses centros de ossificação do esterno em todos os mamíferos, incluindo o homem, têm uma relação constante com a posição das costelas (KHERA, 1981).

A ocorrência de anomalias nos ossos do esterno são mais comuns para agenesia, fusão e malposicionamento. A aparição de sete esternébrios é menos frequente e pode ocorrer junto com costelas rudimentares lombares (MAKRIS, 2009; RENGASAMY; PADMANABHAN, 2004).

Figura 20 – Presença de sítio de ossificação supranumerário nos ossos do esterno indicados pelas setas. Na figura (A) feto do grupo 1200 mg/kg; (B) feto do grupo 600 mg/kg.



Fonte: Próprio autor

Cabe destacar que a ocorrência das anomalias em nosso trabalho aconteceu de forma significativa na dose de 1200 mg/kg.

Diferentemente dos extratos das folhas, fetos de ratas Sprague Dawley tratadas com o óleo de semente de *A. indica* nas doses de 1,2 mL/dia apresentaram anomalias significativas relacionadas a forma dos esternébrios sem apresentar fetos com sete esternébrios. Nesse mesmo estudo, o extrato

etanólico 70% das sementes de *A. indica* na dose de 1,0 mg/mL/dia contendo azadiractina não apresentou alterações esqueléticas significativas em relação ao controle (DALLAQUA *et al.*, 2013). De forma semelhante, a azadiractina a 12% preparação oleosa, originária da Índia, utilizada durante os dias DG 6 – 15 nas doses de 500, 1000 e 1500 mg/kg, por via oral, não apresentou toxicidade esquelética significativa nos fetos (SRIVASTAVA; RAIZADA, 2001).

Contrariamente aos achados apresentados, a análise esquelética por nós realizada mostrou que o extrato seco (etanol 30%) de folhas de *A. indica* induziu anomalias no sistema esquelético. Destaca-se que o desenvolvimento dos ossos do esterno nos últimos dias da gestação é influenciado por vários fatores e continua após o nascimento. Contudo para definir se a importância de uma variação faz-se necessário saber se é permanente ou reversível e seu impacto sobre a vida do animal (STAZI *et al.*, 1992).

Embora tenham sido observados sítios de ossificação supranumerários no esterno, seu valor é limitado quando analisado o risco que esse achado representa para humanos e por não haver boa correlação (KHERA, 1981).

Por se tratar de materiais vegetais diferentes, a comparação de resultados entre os estudos fica prejudicada, pois é possível que os extratos apresentem composição fitoquímica diferente (DALLAQUA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015; SRIVASTAVA; RAIZADA, 2001). Toda essa diversidade de fatores não só dificulta a comparação de resultados como reforça a necessidade de melhor caracterização dos extratos. A inerente complexidade da matriz vegetal torna o processo de caracterização e de doseamento dos compostos majoritários e não majoritários mais complexo e caro. Por esses motivos a avaliação de segurança de medicamentos fitoterápicos com ensaios pré-clínicos é essencial.

Outro fator importante é a existência de avaliação da toxicidade fetal e materna para compostos presentes em *A. indica* de forma isolada. A rutina, epicatequina e catequina foram utilizadas em altas doses na alimentação de camundongos durante a gravidez e não foi verificada toxicidade materna e fetal (LESSER, 2015). Tais observações sugerem haver compostos não identificados nos extratos das folhas e semente os quais podem, isoladamente ou em sinergia, causar toxicidade esquelética. Por isso, faz-se necessário

mais estudos para elucidar a composição fitoquímica, mecanismo de ação, quantificação e isolamento dos diversos compostos presentes nos extratos, especialmente nas doses terapêuticas utilizadas. Esse tipo de informação pode contribuir para identificar não só marcadores fitoquímicos de eficácia mas também de toxicidade.

5.4.1.9 Análise visceral

As alterações identificadas na análise visceral dos fetos de ratas tratadas com o veículo ou extrato seco das folhas de *A. indica* não foram estatisticamente significativas e encontram-se descritas nas Tabelas 17 e 18. No entanto, foram encontradas algumas malformações tanto no grupo veículo como nos grupos que receberam as doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg. As malformações no grupo tratado com a dose 600 mg/kg ocorreram no mesmo feto em que foram detectadas a magroglossia e exencefalia, com exceção da fenda palatina. Na Figura 21A e 21B é possível verificar a fenda palatina presente em um feto do grupo tratado com a dose de 600 mg/kg.

Figura 21 – Fenda palatina em feto de rata *Wistar* tratada, via oral, com a dose de 600 mg/kg de extrato seco das folhas de *Azadirachta indica*. (A) Fenda palatina visualizada no corte transversal da boca; (B) Fenda palatina no corte frontal da cavidade nasal

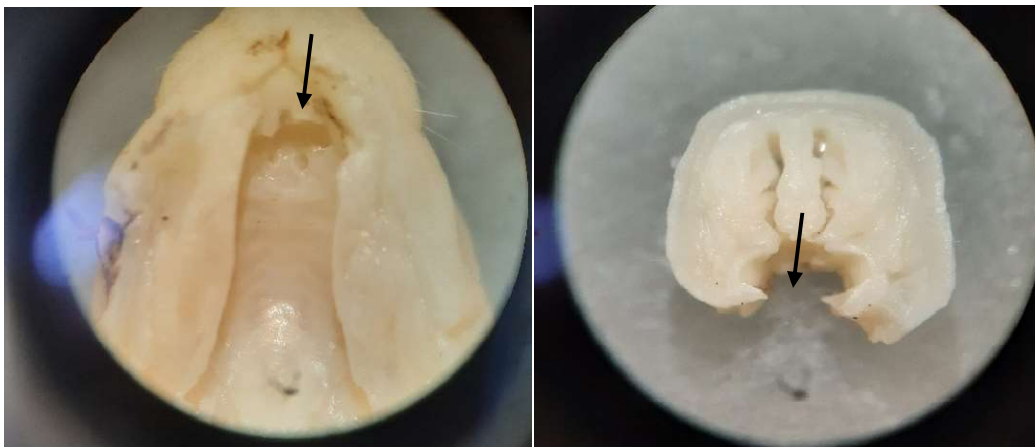


Tabela 17 – Alterações e malformações observadas nos cortes da cabeça de fetos de ratas *Wistar* tratadas durante a gestação, via oral, com o veículo ou extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg

Parâmetros	Extrato seco de <i>A. indica</i> (mg/kg)			
	Veículo	300	600	1200
Ninhadas	10	10	10	10
Fetos	56	57	59	62
Cortes da cabeça				
<i>Fenda palatina</i>	0	0	1(1,69)	0
<i>Bulbo olfatório ausente</i>	0	0	1(1,69)	0
<i>Retina ausente</i>	0	0	1(1,69)	0
<i>Córnea ausente lado esquerdo</i>	0	0	1(1,69)	0
<i>Hemisfério cerebral disforme</i>	0	0	1(1,69)	0
<i>Ventrículo disforme</i>	0	0	1(1,69)	0
<i>3º ventrículo ausente</i>	0	0	0	1(1,61)

Nota: entre parênteses estão os valores das porcentagens relativas de fetos afetados (total de fetos afetados/total de fetos analisados por grupo) x 100. Fora dos parênteses estão os valores absolutos. O teste qui quadrado não mostrou diferença significativa entre os grupos.

Tabela 18 – Alterações e malformações observadas nos fetos de ratas *Wistar* tratadas durante a gestação, via oral, com o veículo ou extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* nas doses de 300, 600 ou 1200 mg/kg.

Parâmetros	Extrato seco de <i>A. indica</i> (mg/kg)			
	Veículo	300	600	1200
Ninhadas	10	10	10	10
Fetos	56	57	59	62
Tireóide pequena	2(3,57)	0	0	0
Pulmão não expandido	1(1,79)	0	0	0
Ausência da veia cava esquerda	1(1,79)	0	0	0
Ausência da veia cava direita	1(1,79)	0	0	0
Edema subcutâneo	0	0	0	1(1,61)
Estômago ausente	0	0	0	1(1,61)
Pâncreas ausente	0	0	0	1(1,61)
Baço ausente	0	0	0	1(1,61)
Intestino interrompido	0	0	0	1(1,61)
Timo grande	0	0	0	1(1,61)
Medula ausente	0	0	1(1,69)	0
Dilatação da pelve renal	0	1(1,75)	1(1,69)	1(1,61)
Fígado com manchas amareladas	0	0	1(1,69)	0
Bexiga dilatada	0	0	1(1,69)	0

Nota: entre parênteses estão os valores das porcentagens relativas de fetos afetados (total de fetos afetados/total de fetos analisados por grupo) x 100. Fora dos parênteses estão os valores absolutos. O teste qui quadrado não mostrou diferença significativa entre os grupos.

5.5 Citotoxicidade e mutagenicidade pelo teste do micronúcleo

Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre a relação PCE/NCE e dos grupos tratados com extrato das folhas de *Azadirachta indica* (300, 600 e 1200 mg/kg de peso corporal) e o grupo controle negativo. Além disso, o extrato não aumentou a % de MN em eritrócitos imaturos (PCE) em nenhuma dose testada (300, 600 e 1200 mg/kg de peso corporal) em comparação com o grupo controle negativo (Tabela 19). Estes resultados sugerem que o extrato das folhas de *A. indica* não é citotóxico nem mutagênico para células de medula óssea de ratas *Wistar* em tratamentos de 21 dias. O extrato etanólico das folhas de *A. indica* apresentou efeito antimutagênico no teste do micronúcleo utilizando eritrócitos do sangue

periférico do peixe de água doce *Chana punctatus*. Foram utilizados os compostos pentaclorofenol (PCP) e ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para indução de mutagenicidade, tanto na presença de extrato de *A. indica* como na sua ausência. Nesse estudo, a frequência de micronúcleos reduziu significativamente nas células que continham o extrato de *A. indica*. Já quando o extrato foi testado sem a presença de outros compostos não foi verificada diferença significativa entre o extrato e o controle em relação a frequência de micronúcleos (FARAH; ATEEQ; AHMAD, 2006).

Tabela 19 - Avaliação da citogenotoxicidade do extrato seco de *Azadirachta indica* em ratos Wistar. Citotoxicidade da medula óssea expressa como relação entre eritrócitos policromático (PCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE). E genotoxicidade expressa pela frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) para cada 4000 PCEs.

Grupos	n	Doses	Tempo de exposição	Razão de PCE/NCE	PCEMN/4000 PCE
Controle negativo	5	-	24 h	1,15 ± 0,07	2,2 ± 0,83
	5	300 mg/kg	24 h	1,31 ± 0,25	3,0 ± 1,0
<i>Azadirachta indica</i>	5	600 mg/kg	24 h	1,15 ± 0,08	3,4 ± 1,67
	5	1200 mg/kg	24 h	1,12 ± 0,10	3,6 ± 0,89

Controle negativo: H₂O; Resultados estão expressados como média ± desvio padrão. Os grupos foram comparados usando Anova seguido do teste de Tukey.

O teste do micronúcleo é um dos testes preconizados para avaliação da genotoxicidade pelo Guia de avaliação de genotoxicidade de substâncias ou preparações herbais da EMA - *Guideline on the assessment of genotoxicity of Herbal substances/preparations*, 2008. Os PCE são originados a partir da perda do núcleo das células divididas a partir do eritroblasto. Dessa feita, devida a falha no processo de enucleação fragmentos cromossômicos permanecem no PCE na forma de micronúcleos (SUZUKI *et al.*, 1989). O teste é capaz detectar esses fragmentos de DNA originários do núcleo resultantes de dano cromossômicos aneugênicos ou clastogênico (OECD, 2016). Assim o resultado do teste sugere que extrato etanólico das folhas de *A. indica* não é genotóxico.

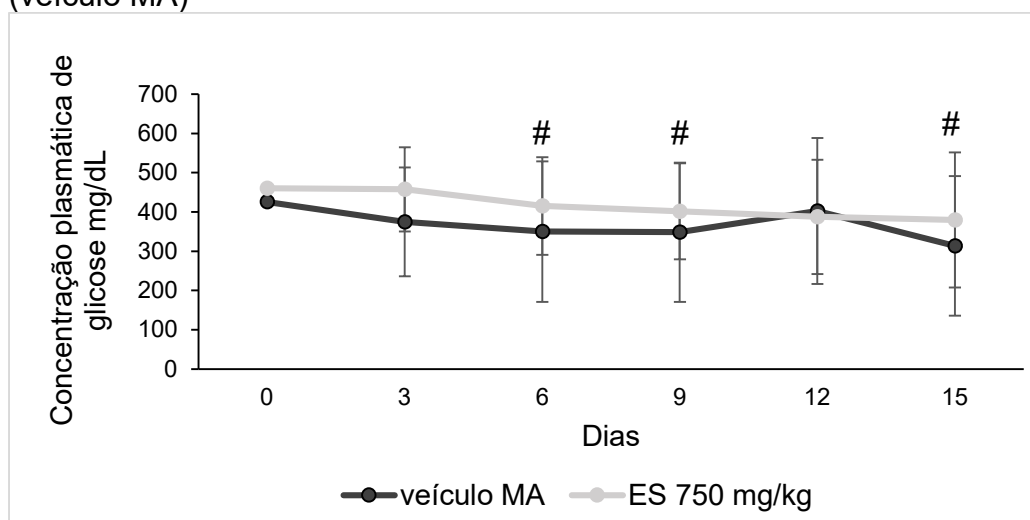
5.6 Avaliação do efeito hipoglicemiante

No grupo ES a redução da glicemia foi de 18% e no grupo veículo MA de 26%. Além disso, no grupo ESM a redução da glicemia foi de 0,4% e no grupo veículo MI de 3,67%. As concentrações de glicose média dos animais tratados com ESM e ES foram de 418 mg/dL e 380 mg/dL, respectivamente, após 15 dias de tratamento. Ambos os extratos, portanto, não foram eficazes em restabelecer os níveis normoglicêmicos dos animais.

Os resultados das concentrações plasmáticas de glicose de ratos diabéticos tratados com 750 mg/kg de ES de folhas de *A. indica* e veículo MA (veículo/maltodextrina e aerosil®) ao longo de 15 dias são apresentados na Figura 22. A Anova para medidas repetidas apenas apontou diferença entre os dias de tratamento [F(5,50) = 3,77, $p=0,006$]. Não foi observada diferença entre os tratamentos [F(1,10) = 0,33, $p=0,57$] e nem interação entre tratamento e dias [F(5,50) = 1,01, $p=0,42$].

O teste F de comparações planejadas mostrou que existe diferença na concentração plasmática de glicose nos dias 6, 9 e 15 em relação ao dia 0 (zero) ($p<0,05$).

Figura 22 – Valores da concentração plasmática da glicose (mg/dL) dos animais diabéticos (n=6/grupo) tratados, via oral, com 750 mg/kg de extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* (ES) e veículo/maltodextrina e aerosil® (veículo MA)

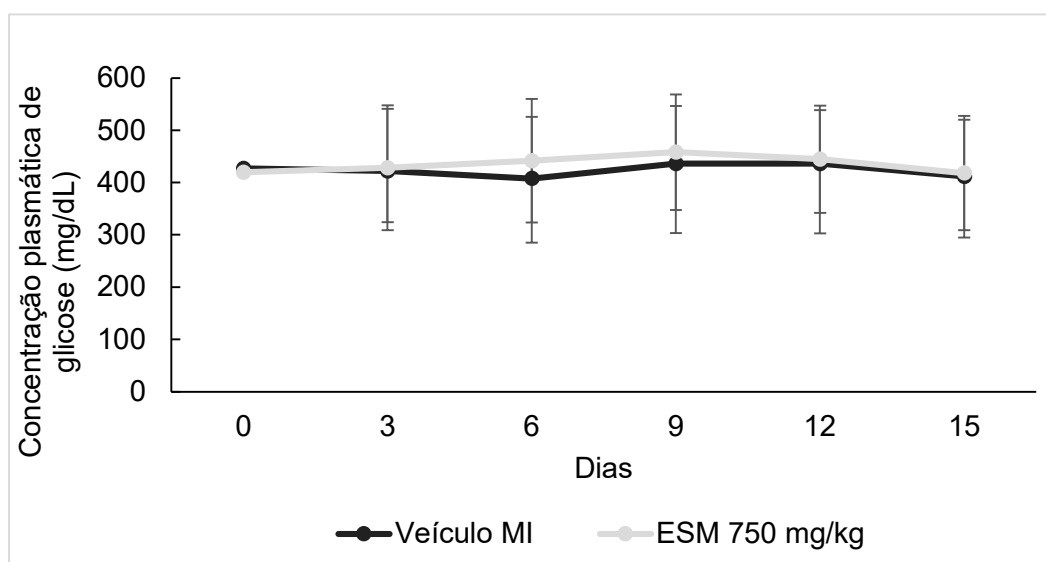


Nota: Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Anova para medidas repetidas.

diferente do dia 0, $p<0,05$ efeito significativo para o fator dia. Não foi observada diferença significativa na glicemia entre os grupos.

Os resultados das concentrações plasmáticas de glicose de ratos diabéticos tratados com 750 mg/kg de ESM de folhas de *A. indica* e veículo MI (veículo/microcápsulas inertes) durante 15 dias são apresentados na Figura 23. A Anova para medidas repetidas não apontou diferença entre os tratamentos [$F(1,10) = 0,03$, $p=0,86$], dias [$F(5,50) = 0,97$, $p=0,44$] e interação entre tratamento e dias [$F(5,50) = 0,34$, $p=0,88$].

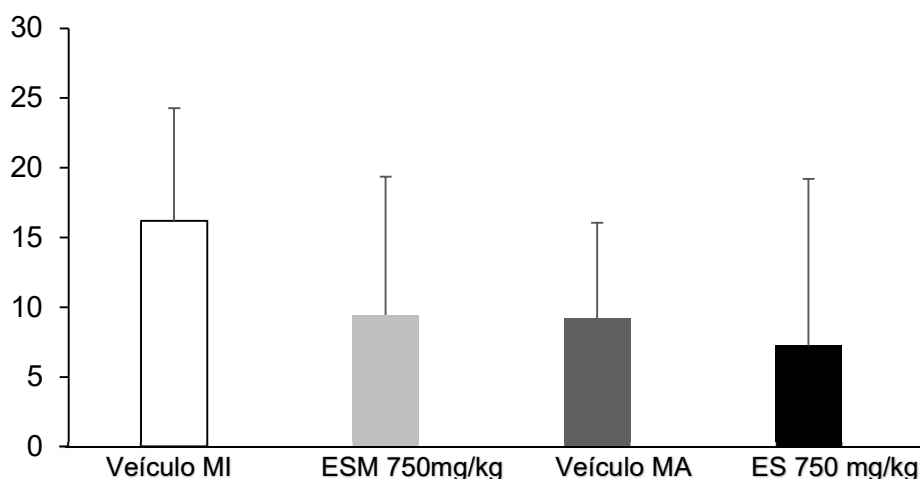
Figura 23 – Valores da concentração plasmática da glicose (mg/dL) dos animais ($n=6$ /grupo) tratados, via oral, com 750 mg/kg de extrato seco microencapsulado das folhas de *Azadirachta indica* (ESM) e veículo/microcápsulas inertes (veículo MI)



Nota: Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão. Não foi observada diferença significativa na glicemia entre os grupos (Anova para medidas repetidas). O nível de significância foi de $p<0,05$.

Os valores referentes ao ganho de massa corporal dos grupos de animais diabéticos tratados com Veículo MI, ESM, Veículo MA e ES são mostrados na Figura 24. O ganho de massa corporal do grupo de ratos diabéticos tratados com Veículo MI, ESM, Veículo MA e ES não apresentou diferença significativa [$F(3,20) = 1,04$; $p=0,39$].

Figura 24 – Ganho de massa corporal (n=6) dos grupos de animais diabéticos tratados, via oral, com o veículo microcápsulas inertes (veículo MI); com extrato microencapsulado das folhas de *Azadirachta indica* na dose de 750 mg/kg (ESM); veículo Aerosil® + maltodextrina (veículo MA) e com extrato seco das folhas de *Azadirachta indica* na dose de 750 mg/kg (ES).



Nota – As barras representam a média \pm desvio padrão da média. ANOVA unifatorial.

Os quatro grupos de animais apresentaram ganhos absolutos e percentuais de massa corporal, respectivamente, sendo: veículo MA 9,17 g (4,22%), ES 750 mg/kg 7,5 g (3,11%); veículo MI 16,21 g (7,90 %) e ESM 750 mg/kg 9,45 g (4,13%). Embora percentualmente os resultados possam sugerir um aumento maior no grupo tratado com o veículo MI a diferença não foi significativa.

Um efeito modulador sobre o ganho de peso foi identificado em ratos diabéticos e não diabéticos tratados com extrato de folhas de *A. indica* na dose de 500 mg/kg por 50 dias (AKINOLA; CAXTON-MARTINS; DINI, 2010). Os animais normoglicêmicos tratados com o extrato apresentaram menor ganho de massa corporal (19,9%) enquanto os ratos diabéticos tratados com glibenclamida o maior (49,9%) (AKINOLA; CAXTON-MARTINS; DINI, 2010). Nesse mesmo estudo, foi insignificante o ganho de massa entre o grupos normoglicêmicos e diabéticos tratados com extrato de folhas de *A. indica* (AKINOLA; CAXTON-MARTINS; DINI, 2010). A hipótese proposta para esse efeito seria um aumento na produção, secreção ou ação da leptina provocada

pelo extrato de folhas de *A. indica* (SZAYNA *et al.*, 2000). Devido as limitações do desenho experimental não é possível sugerir efeito modulador pois, não foi utilizado grupo controle normoglicêmico. Isso porque o estudo teve seu desenho alterado em razão da não evidência do efeito hipoglicemiante.

O efeito hipoglicemiante é bastante descrito para diferentes extratos de *A. indica* em animais, sendo sugeridos diferentes mecanismos para essa ação. Dentre os mecanismos propostos está a regeneração das células beta pancreáticas, aumento do glicogênio no músculo e fígado, e aumento da secreção de insulina (AKINOLA; CAXTON-MARTINS; DINI, 2010; BHAT *et al.*, 2011; GUTIERREZ *et al.*, 2011).

Os efeitos hipoglicemiantes foram demonstrados com diferentes extratos das folhas de *A. indica* de diferentes localidades, como: etanólico, nas doses de 500 mg/kg e 800 mg/kg proveniente da Nigéria (AKINOLA *et al.*, 2011; EKAIDEM *et al.*, 2007), clorofórmico, na dose de 300 mg/kg do México (GUTIERREZ *et al.*, 2011) e aquoso 500 mg/kg de Bangladesh e 400mg/kg da Índia (AKTER *et al.*, 2014; SATYANARAYANA *et al.*, 2015). No entanto, ausência de efeito hipoglicemiante foi verificado para o extrato aquoso 0,8% das folhas da Jamaica (MCCALLA *et al.*, 2015) e oleoso das sementes do Brasil (DALLAQUA *et al.*, 2013).

Ante a relevância dos efeitos hipoglicemiantes acima descritos vimos a oportunidade de testar a formulação do extrato microencapsulado e seco de folhas de *A. indica* oriundas de espécimes cultivados no Brasil. Extratos secos apresentam propriedades físico-químicas vantajosas e foram padronizados quanto a sua produção e caracterização. Ao contrário dos extratos brutos, apenas concentrados em rotaevaporador, o extrato seco e o microencapsulado são pós com baixa atividade de água e umidade, que podem ser utilizados na produção de uma variedade de formas farmacêuticas sólidas ou líquidas. A adição de adjuvantes e o processo de secagem por aspersão conservam os fitoquímicos e conferem maior estabilidade aos extratos (OLIVEIRA; PETROVICK, 2010). Adicionalmente, os excipientes maltodextrina (HOFMAN; VAN BUUL; BROUNS, 2016) e aerosil® utilizados na produção do extrato seco são amplamente utilizados na indústria alimentícia e farmacêutica por sua inércia e segurança.

As maltodextrinas industrialmente são produzidas a partir do amido por meio de hidrólise ácida ou ação enzimática e são polímeros de dextrose de grande variedade. Assim, a depender do tipo de processo utilizado, a maltodextrina pode ser considerada digerível ou não digerível, conferindo versatilidade para esse insumo (HOFMAN; VAN BUUL; BROUNS, 2016). Devido a sua capacidade de ser convertida em glicose, a maltodextrina utilizada nos extratos secos foi sugerida, inicialmente, como responsável pela ausência de efeito hipoglicemiante observada no presente estudo. Porém, a administração do extrato foi realizada entre 9 - 10 horas da manhã e a glicemia dos animais foi aferida antes da administração do extrato. A glicemia começa a aumentar 10 minutos após ingestão de alimentos e atinge seu pico ao redor de 60 minutos e retorna a níveis próximos aos basais após três horas (GROSS, FERREIRA, OLIVEIRA, 2003). Dessa forma, o efeito da maltodextrina sobre a glicemia não seria percebido 24 horas após a administração do extrato. Ademais, a glicemia era aferida nos ratos com livre acesso a ração e água, situação essa que não influenciou no efeito hipoglicemiante descrito por Akinola *et al.* (2011).

A ausência de efeito hipoglicemiante observada no presente estudo sugere outras hipóteses, tais como, diferenças na composição fitoquímica decorrentes da localização geográfica onde as plantas foram cultivadas e na preparação dos extratos (CHUA, 2013). Fatores como radiação UV-B, período de seca ou chuva, nutrientes, estação do ano podem influenciar qualitativa e quantitativamente na produção de compostos do metabolismo secundário (MACHADO, 2005; SUZUKI; HONDA; MUKASA, 2005). O efeito hipoglicemiante dos extratos é atribuído, muitas vezes, a uma possível sinergia dos constituintes do extrato, todavia a rutina é indicada por alguns autores como o principal agente hipoglicemiante (GHORBANI, 2017; NITURE; ANSARI; NAIK, 2014; PRINCE; KAMALAKKANNAN, 2006).

A rutina isolada demonstrou efeito hipoglicemiante ou antidiabético quando utilizada em doses de 50 a 100 mg/kg de peso corporal em ratos *Wistar* machos (GHORBANI, 2017; PRINCE; KAMALAKKANNAN, 2006). Nos extratos de folhas de *A. indica* citados na literatura, a presença de rutina é frequentemente mencionada (ACHI *et al.*, 2018; AKINOLA *et al.*, 2010; DORABABU *et al.*, 2004; VERGALHO; PANZARINI; DINI, 2019). Ocorre que

a quantidade de rutina nos extratos de *A. indica* do presente estudo e em outros extratos vegetais hipoglicemiantes é bastante inferior à dose de rutina quando utilizada como único ativo, indicando que a sinergia entre ela e outros compostos possa ser de fato, relevante para o efeito hipoglicemiante.

Em estudo realizado com *Physalis peruviana*, por exemplo, o efeito hipoglicemiante foi atribuído principalmente à rutina por estar presente como composto majoritário no extrato butanólico do cálice das flores dessa planta (ECHEVERRY *et al.*, 2018). Todavia, as concentrações de rutina nos extratos de *Physalis peruviana* e das folhas de *A. indica* do presente estudo são de 14,54 e 11,80 mg/kg, respectivamente, ou seja, inferiores aos 50 a 100 mg de rutina efetiva como hipoglicemiante de forma isolada. Assim, ainda que a rutina seja o componente principal para o efeito hipoglicemiante, sugere-se que outros compostos desempenhem papel importante para a ocorrência do efeito. Esses compostos, presentes em *P. peruviana*, podem estar ausentes ou em concentrações menores nos espécimes de *A. indica* cultivados no Brasil e utilizados neste estudo.

Ademais, como já apontado, os extratos de *A. indica* apresentaram variações nas suas composições fitoquímicas nos diferentes trabalhos (ACHI *et al.*, 2018; KANAGASANTHOSH; SHANMUGAPRIYAN; KAVIRAJAN 2015; KINGSLEY *et al.*, 2012; OSENI *et al.*, 2012; SOARES, 2020). O extrato etanólico 70% das folhas de *A. indica* originária da Nigéria na dose de 500 mg/kg, utilizado por Akinola *et al.* (2011) apresentou pronunciado efeito hipoglicemiante. Extrato produzido conforme Akinola *et al.* (2011) com folhas de *A. indica* retiradas da mesma localidade tiveram seus flavonoides identificados e quantificados por HPLC e os constituintes encontrados foram rutina 3,27%, quercitrina 0,21%, isoquercitrina 0,92%, nicotiflorina 0,28% e astragalina 0,078%. A quercetina e a myricetina não estavam presentes e a rutina foi também o composto majoritário (VERGALHO; PANZARINI; DINI, 2019).

Em nosso trabalho rutina foi o composto majoritário sendo também identificada a quercetina. Contudo o perfil cromatográfico do extrato seco de *A. indica* (Figura 5) mostra a presença de outros compostos os quais não puderam ser identificados. Ademais, utilizamos etanol 30% para a obtenção do extrato, com base em estudos de otimização da extração, realizados por

Soares *et al.* (2022). Este estudo tinha o intuito de obter os maiores teores de flavonoides totais, expressos como rutina. Sugere-se, portanto, mais uma vez, que outros compostos, possivelmente não extraídos ou ausentes no material vegetal coletado no Brasil, exerçam importante papel sobre o efeito hipoglicemiante, em sinergia com a rutina, já que foram utilizadas condições extrativas favoráveis à obtenção dos maiores teores de rutina em nosso extrato.

Destaca-se o estudo clínico randomizado com extrato aquoso das folhas e galhos de *A. indica* no qual observou-se diminuição da glicemia e da hemoglobina glicada em pacientes diabéticos quando comparado ao controle (PINGALI *et al.*, 2020). O extrato utilizado tinha em sua composição: isoquercitrina, rutina, apigenina rutinosídeo, derivados da rutina e myo-inositol monofosfato, este último como majoritário (PINGALI *et al.*, 2020).

Outros aspectos dignos de nota nos estudos de avaliação do efeito hipoglicemiante de extratos de *A. indica* citados na literatura são a duração dos testes e a variabilidade do tempo necessário para obtenção do efeito. Em Akinola *et al.* (2011) após duas semanas de tratamento os ratos ficaram normoglicêmicos e em Ekaidem *et al.* (2007) em sete dias o efeito hipoglicemiante foi verificado.

Os dados apresentados tornam evidente a importância da identificação da origem da planta, da caracterização físico-química detalhada dos extratos, e da padronização dos processos de obtenção dos produtos derivados de plantas. No Brasil, o registro de medicamentos fitoterápicos está disposto na RDC Nº 26/2014, da Anvisa (BRASIL, 2014). Nesse regulamento são definidos critérios a serem atendidos pelos interessados em registrar medicamentos e visam garantir a qualidade, segurança e eficácia dos mesmos.

6 CONCLUSÃO

O extrato seco das folhas de *A. indica* apresentou como composto majoritário o flavonoide rutina, contudo outros compostos estão presentes no extrato e não foram identificados e caracterizados. A utilização de etanol 30% (p/p) foi eficiente na extração de flavonoides e a secagem por aspersão conferiu características físico-químicas adequadas ao pó. O método analítico para doseamento da rutina por CLAE/DAD foi validado e mostrou ser linear, preciso, exato, robusto e seletivo, sendo evidenciada a ocorrência do efeito matriz.

O extrato seco das folhas de *A. indica* nas doses de 300, 600 e 1200 mg/kg não ocasionou sinais de toxicidade materna e não comprometeu o desenvolvimento reprodutivo de ratas Wistar. A análise da morfologia externa e visceral dos fetos não mostrou toxicidade significativa, enquanto a análise esquelética sugere alguma capacidade de causar anomalias nos ossos do esterno na dose de 1200 mg/kg. O teste do micronúcleo sugere que o extrato não é citotóxico e nem genotóxico.

A ausência de efeito hipoglicemiante para os extratos testados aponta para diferenças fitoquímicas decorrentes do local de cultivo da planta e reforçam a hipótese de um possível efeito sinérgico dos compostos. Resultados conflitantes a respeito da eficácia de produtos vegetais destacam a importância de uma detalhada caracterização físico-química dos extratos testados. Ademais, mostram a necessidade de estudos voltados para a elucidação dos compostos efetivamente envolvidos na ação hipoglicemiante de *A. indica*.

Outras aplicações do extrato, a identificação e doseamento dos outros compostos presentes podem ser objeto de estudos futuros.

ACHI, N. K. *et al.* Therapeutic effects of *Azadirachta indica* A. Juss. leaves in malaria-induced male Wistar rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research**, v. 6, p. 191–204, 2018.

AKINOLA, O. B.; CAXTON-MARTINS, E. A.; DINI, L. Chronic Treatment with Ethanollic Extract of the Leaves of *Azadirachta indica* Ameliorates Lesions of Pancreatic Islets in Streptozotocin Diabetes. **International Journal of Morphology**, v. 28, n. 1, p. 291-302, mar. 2010.

AKINOLA, O. *et al.* Effects of combined leaf extract of *Vernonia amygdalina* and *Azadirachta indica* on hepatic morphology and hepatotoxicity markers in streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, n. 12, p. 1373–1379, 2011.

AKINOLA, O. *et al.* Ameliorative Effects of Ethanollic Leaf Extract of *Azadirachta indica* on Renal Histologic Alterations in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 39, n. 05, p. 903–916, jan. 2011.

AKTER, F. *et al.* Anti-diabetic Effect of Neem and Spirulina in Alloxan Induced Diabetic Mice. **International Journal of Current Research and Academic Review**, v. 2, p. 124–134, 2014.

AKTER, R. *et al.* Comparative Studies on Antidiabetic effect with phytochemical screening of *Azadirachta indica* and *Andrographis paniculata*. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 5, n. 2, p. 122–128, 2013.

ALADAKATTI, R. *et al.* Effect of lyophilized *Azadirachta indica* leaf powder on biochemical parameters of testis and epididymis in albino rats. **International Journal of Biological and Chemical Sciences**, v. 4, n. 1, p. 75–87, 2010.

ALADAKATTI, R. H.; AHAMED, R. N. Changes in Sertoli cells of albino rats induced by *Azadirachta indica* A. Juss leaves. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 16, n. 1, p. 67–80, 2005.

ALZOHAIRY, M. A. Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1–11, 2016.

AOAC INTERNATIONAL. Appendix K: guidelines for dietary supplements and botanicals. **AOAC Official Methods of Analysis**, v. 2, p. 1-32, 2019.

ARUMUGAM, A. *et al.* Neem leaf extract inhibits mammary carcinogenesis by altering cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis. **Cancer Biology & Therapy**, v. 15, n. 1, p. 26–34, jan. 2014.

AVAGLIANO, L. *et al.* Overview on neural tube defects: From development to physical characteristics. **Birth Defects Research**, v. 111, n. 19, p. 1455–1467, 15 nov. 2019.

BABALOLA, O. O.; AREOLA, J. O. Interactive roles of terpenoid extract from the leaves of neem plant (*Azadirachta indica*, A. Juss) on lead induced toxicity in pregnant rabbits. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 1102–1107, 2010.

BASIR, S.; SHAILEY, S. Strengthening of antioxidant defense by *Azadirachta indica* in alloxan-diabetic rat tissues. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 3, n. 3, p. 130–135, 2012.

BHAT, M. *et al.* Antidiabetic Properties of *Azadirachta indica* and *Bougainvillea spectabilis*: *In Vivo* Studies in Murine Diabetes Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

BHOWMIK, D. *et al.* Herbal Remedies of *Azadirachta indica* and its Medicinal Application. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 62–72, 2010.

BITTENCOURT, A. M. **O CULTIVO DO NIM INDIANO (*Azadirachta indica* A. Juss): UMA VISÃO ECONÔMICA**. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, p.126. 2006.

BOADU, K. O. *et al.* Toxicological analysis of the effect of neem tree extract in an organism. **European Journal of Experimental Biology**, p. 160–171, 2011.

BOSE, A. *et al.* Neem Leaf Glycoprotein Induces Perforin-mediated Tumor Cell Killing by T and NK Cells Through Differential Regulation of IFN γ Signaling. **Journal of Immunotherapy**, v. 32, n. 1, p. 12, 2009.

BRAGA, T. M. *et al.* *Azadirachta indica* A. Juss. *In Vivo* Toxicity—An Updated Review. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 1–21, 2021.

BRASIL. **Lei nº 9782, de 26 de janeiro de 1999**. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. Brasília, DF. 26 jan. 1999, Sec. 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília: Anvisa. 2013.

BRASIL. IN nº 4 de 18 de junho de 2014. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de orientação para registro de**

Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Brasília: Anvisa. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 166, 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos.** Brasília: Anvisa. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira.** 6ª ed. Brasília, DF: Anvisa, 2019a. v. I

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estudos não clínicos necessários ao desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos.** Brasília: Anvisa. 2019 b.

BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação sobre validação de métodos analíticos.** DOQ-CGCRE-008. INMETRO. 2020.

BROADHEAD, J.; EDMOND ROUAN, S. K.; RHODES, C. T. The spray drying of pharmaceuticals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 18, n. 11–12, p. 1169–1206, 1992.

CAVALLI, V.L.L.O.; SORD, C.; TONINI, K., GRANDO, A.; MUNERON, T.; GUIGI, A.; ROMAN JÚNIOR, A.W. Avaliação *in vivo* do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos de raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) Bernh. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.17, n.1, p. 64-70. 2007

CHAHOU, I. *et al.* Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reproductive Toxicology**, v. 13, n. 5, p. 375–381, 1999.

CHATTOPADHYAY, R. R. Possible mechanism of antihyperglycemic effect of *Azadirachta indica* leaf extract. Part IV. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 27, n. 3, p. 431–434, abr. 1996.

CHIRUMBOLO, S. The Role of Quercetin, Flavonols and Flavones in Modulating Inflammatory Cell Function. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 9, n. 4, p. 263–285, 2010.

CHO, B. O. *et al.* Anti-inflammatory activity of myricetin from *Diospyros lotus* through suppression of NF- κ B and STAT1 activation and Nrf2-mediated HO-1 induction in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 80, n. 8, p. 1520–1530, 2016.

CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 805–817, dez. 2013.

DALLAQUA, B. *Azadirachta indica* treatment on the congenital malformations of fetuses from rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 1109-1113, 2013.

DAMASCENO, D. C. **Anomalias congênitas: estudos experimentais**. Belo Horizonte: COOPMED, 2008.

DASGUPTA, T. *et al.* Chemopreventive potential of *Azadirachta indica* (Neem) leaf extract in murine carcinogenesis model systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, n. 1, p. 23–36, 2004.

DE OLIVEIRA AZEVEDO, A. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of myricetin 3-O- β -galactoside isolated from *Davilla elliptica*: involvement of the nitrenergic system. **Journal of Natural Medicines**, v. 69, n. 4, p. 487–493, 2015.

DENNY, K. H.; FAQI, A. S. Nonclinical Safety Assessment of Developmental and Reproductive Toxicology: Considerations for Conducting Fertility, Embryo–Fetal Development, and Prenatal and Postnatal Developmental Toxicology Studies. *In*: FAQI, A. S. (Ed.). **Developmental and Reproductive Toxicology**. Methods in Pharmacology and Toxicology. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 43–115.

DORABABU, M. *et al.* Effect of aqueous extract of neem (*Azadirachta indica*) leaves on offensive and defensive gastric mucosal factors in rats. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 50, p. 241-249, 2006

DUSSE, L. M. S. *et al.* BIOMARKERS OF RENAL FUNCTION: WHAT IS CURRENTLY AVAILABLE? **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 1, p. 41-51, 2017.

ECHEVERRY, S. M. *et al.* Development and optimization of microparticles containing a hypoglycemic fraction of calyces from *Physalis peruviana*. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 8, p. 10–18, 30 maio 2018.

EKAIDEM, I. S. *et al.* Effects of ethanolic extract of *Azadirachta indica* leaves on lipid peroxidation and serum lipids of diabetic Wistar rats. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 51, p. 17–20, 2007.

EMA– European Medicines Agency. **Guideline on Risk Assessment of Medicinal Products on Human Reproduction and Lactation: From data to labelling**. 2008. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-risk-assessment-medicinal-products-human-reproduction-lactation-data-labelling_en.pdf. Acesso em: 24 out. 2022

EMA– European Medicines Agency. **ICH S5 (R3) guideline on reproductive toxicology: Detection of Toxicity to Reproduction for Human Pharmaceuticals**. 2020. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientificguideline/>

ich-s5-r3-guideline-reproductive-toxicology-detection-toxicityreproduction-human-pharmaceuticals_en.pdf. Acesso em: 10 jul. 2020

EMA– European Medicines Agency. **Guideline on the assessment of Genotoxicity of Herbal substances/preparations**. 2008. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-assessment-genotoxicity-herbal-substances/preparations_en.pdf. Acesso em: 24 out. 2022

EPA– United States Environmental Protection Agency. **Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment**, December 5, 1991. Disponível em: <https://cfpub.epa.gov/ncea/raf/pdfs/devtox.pdf>. Acesso em: 24 out. 2022

FARAH, M. A.; ATEEQ, B.; AHMAD, W. Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests. **Science of The Total Environment**, v. 364, n. 1–3, p. 200–214, jul. 2006.

FEDERIUK, I. F.; CASEY, H. M.; QUINN, M. J.; WOOD, M. D.; WARD, W. K. Induction of type-1 *diabetes mellitus* in laboratory rats by use of alloxan: route of administration, pitfalls, and insulin treatment. **Comparative Medicine**. Portland, v.54, n.3, p.252-257, 2004.

FDA. Food and Drug Administration. **Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods**, 1994. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/reviewer-guidance-validation-chromatographic-methods>. Acesso em: 11 out. 2022

GHATULE, R. *et al.* Effect of *Azadirachta indica* leaves extract on acetic acid-induced colitis in rats: Role of antioxidants, free radicals and myeloperoxidase. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 2, p. S651–S657, jan. 2012.

GHIMERAY, A. K. *et al.* Antioxidant activity and quantitative estimation of azadirachtin and nimbin in *Azadirachta Indica* A. Juss grown in foothills of Nepal. **African Journal of Biotechnology**, n. 8, p. 3084–3091, 2009.

GHORBANI, A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 305–312, dez. 2017.

GHODESAWAR, M. G. *et al.* Ultrastructural changes in cauda epididymidal epithelial cell types of *Azadirachta indica* leaf treated rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, p. 1091-1095, 2004.

GORANTLA, N. V. *et al.* Neem Derivatives Inhibits Tau Aggregation1. **Journal of Alzheimer's Disease Reports**, v. 3, n. 1, p. 169–178, 14 jun. 2019.

GROSS, J. L.; FERREIRA, S. R. G.; OLIVEIRA, J. E. DE. Glicemia pós-prandial. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 6, p. 728–738, dez. 2003.

GUMIERO, V. C. **Estudo do efeito do extrato de nim (*Azadirachta indica*) em cultura de células de *Rubus fruticosus***. Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 18 nov. 2008.

GUO Y.; LI S.; LI J.; REN Z.; FENGCHEN, WANG X. Anti-hyperglycemic activity of polysaccharides from calyx of *Physalis alkekengi* var. *franchetii* Makino on alloxan-induced mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 249-257, 2017.

GUPTA, S. et al. Protective role of extracts of neem seeds in diabetes caused by streptozotocin in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2–3, p. 185–189, fev. 2004.

GUTIERREZ, R. M.; GUZMAN, M.; GÓMEZ, Y. G. Attenuation of nonenzymatic glycation, hyperglycemia, and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats by chloroform leaf extract of *Azadirachta indica*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 7, n. 27, p. 254-259, 2011.

HAN, Y. et al. β -Asarone improves learning and memory in A β 1-42-induced Alzheimer's disease rats by regulating PINK1-Parkin-mediated mitophagy. **Metabolic Brain Disease**, v. 35, n. 7, p. 1109–1117, out. 2020.

HAO, F. et al. Neem components as potential agents for cancer prevention and treatment. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1846, n. 1, p. 247–257, ago. 2014.

HOFMAN, D. L.; VAN BUUL, V. J.; BROUNS, F. J. P. H. Nutrition, Health, and Regulatory Aspects of Digestible Maltodextrins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 12, p. 2091–2100, 9 set. 2016.

HWANG, S. J. et al. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. **Inflammation Research**, v. 63, n. 1, p. 81–90, jan. 2014.

JUSTINO, G. C.; VIEIRA, A. J. S. C. Antioxidant mechanisms of Quercetin and Myricetin in the gas phase and in solution – a comparison and validation of semi-empirical methods. **Journal of Molecular Modeling**, v. 16, n. 5, p. 863–876, maio 2010.

KANAGASANTHOSH, K.; SHANMUGAPRIYAN, S.; KAVIRAJAN, V. Evaluation of acute toxicity, anti-inflammatory activity and phytochemical screening of ethanolic extract of *Azadirachta indica* leaves. **International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences**, v. 4, p. 1737–1742, 2015.

KELLY, W. L.; BRYDEN, M. M. A Modified Differential Stain for Cartilage and Bone in Whole Mount Preparations of Mammalian Fetuses and Small Vertebrates. **Stain Technology**, v. 58, n. 3, p. 131–134, jan. 1983.

KHALID, S. A.; DUDDECK, H.; GONZALEZ-SIERRA, M. Isolation and characterization of an antimalarial agent of the neem tree *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 5, p. 922–927, set. 1989.

KHARWAR, R. N. *et al.* Harnessing the Phytotherapeutic Treasure Troves of the Ancient Medicinal Plant *Azadirachta indica* (Neem) and Associated Endophytic Microorganisms. **Planta Medica**, v. 86, n. 13/14, p. 906–940, set. 2020.

KHERA, K. S. Common Fetal Aberrations and Their Teratologic Significance: a Review. **Toxicological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 13–18, 1981.

KHERA, K. S. Maternal toxicity in humans and animals: Effects on fetal development and criteria for detection. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 7, n. 3, p. 287–295, 1987.

KHOSLA, P. *et al.* A study of hypoglycaemic effects of *Azadirachta indica* (Neem) in normal and alloxan diabetic rabbits. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 69–74, jan. 2000.

KIM, S. H. *et al.* The Dietary Flavonoid Kaempferol Mediates Anti-Inflammatory Responses via the Src, Syk, IRAK1, and IRAK4 Molecular Targets. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–15, 2015.

KINGSLEY, O.-A. *et al.* A comparative evaluation of in vivo antiplasmodial activity of aqueous leaf extracts of *Carica papaya*, *Azadirachta indica*, *Magnifera indica* and the combination thereof using Plasmodium infected balb/c mice. **International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology**, v. 3, p. 372–378, 2012.

KITAOKA, N. *et al.* The Application of Synthetic Biology to Elucidation of Plant Mono-, Sesqui-, and Diterpenoid Metabolism. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 6–16, jan. 2015.

KUMAR, S. *et al.* Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC-3). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1–2, p. 246–250, abr. 2006.

LEE, J.-W. *et al.* Protective effects of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) leaf extract against cigarette smoke- and lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 40, p. 1932–1940, 10 out. 2017.

LENZ, W. A short history of thalidomide embryopathy. **Teratology**, v. 38, n. 3, p. 203–215, set. 1988.

LERCO, M. M. *et al.* Caracterização de um modelo experimental de *Diabetes mellitus*, induzido por Aloxana em ratos. Estudo clínico e Laboratorial. **Acta Cirúrgica Brasileira**. São Paulo, v. 18, n. 2, p.132-142, 2003.

LESSER, M. N. R. Reproductive and developmental outcomes, and influence on maternal and offspring tissue mineral concentrations, of (-)-epicatechin, (+)-catechin, and rutin ingestion prior to, and during pregnancy and lactation in C57BL/6J mice. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 443-449, 2015.

LIU, J.-C. *et al.* Variation in Phenolics, Flavanoids, Antioxidant and Tyrosinase Inhibitory Activity of Peach Blossoms at Different Developmental Stages. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 20460–20472, 18 nov. 2015.

MACHADO, H., **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “in vivo”**. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 104. 2006.

MAITI, R. *et al.* Role of aqueous extract of *Azadirachta indica* leaves in an experimental model of Alzheimer’s disease in rats. **International Journal of Applied and Basic Medical Research**, v. 3, n. 1, p. 37–47, 2013.

MALONE, M. H. The pharmacological evaluation of natural products — general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 127–147, ago. 1983.

MANSON, J.M.; ZENICK, H.; COSTLOW, R. D. Teratology test methods for laboratory animal. *In*: Hayes, A. W. (Ed.), **Principles and Methods of Toxicology**. Raven Press, New York, 1982. p.141-184.

MAKRIS, S. L. *et al.* Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 2). p. 124, 2009.

MALIK, A. *et al.* In vitro antioxidant properties of Scopoletin. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 659-665, 2011.

MARTÍNEZ, N. *et al.* A study of hypoglycemic effects of *Azadirachta indica* (Neem) in human blood cells. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 26, n. 7, p. 623-629, 2014.

MCCALLA, G. *et al.* Beta Cell Regenerating Potential of *Azadirachta indica* (Neem) Extract in Diabetic Rats. **West Indian Medical Journal**, v. 65, p. 13-17, 2015.

NAGASHAYANA, G.; JAGADEESH, K.; REVANKAR, P. D. S. Evaluation of hypoglycemic activity of neem (*Azadirachta Indica*) in albino rats. **IOSR Journal of Dental and Medical Sciences**, v. 13, n. 9, p. 04–11, 2014

NAIK, M. *et al.* Study of anti-inflammatory effect of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on infected albino rats. **Journal of Health Research and Reviews**, v. 1, n. 3, p. 66, 2014.

NAND, P.; GUPTA, R.; DRABU, S. Insignificant anti-acne activity of *Azadirachta indica* leaves and bark. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 3, n. 1, p. 29, 2012.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL STAFF. **Neem: a tree for solving global problems : report of an ad hoc panel of the Board on Science and Technology for International Development, National Research Council.** Washington, D.C.: National Academy Press, 1992.

NEVES, B. P. D; OLIVEIRA, I. P. D; NOGUEIRA, J. C. M. **Cultivo e utilização do Nim Indiano.** Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Circular técnica 62, 2003. 12.p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/212487>. Acesso em: 07 fev. 2023

NEVES, E. J. M. **A cultura do nim.** Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2008. 97 p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/125501>. Acesso em: 07 fev. 2023

NEVES, E. J. M; CARPANEZZI, A. A. **Prospecção do Cultivo do Nim (*Azadirachta indica*) no Brasil.** Brasília, DF: Embrapa Documentos 185; Colombo: Embrapa Florestas, 2009. 34 p. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/Doc185>. Acesso em: 07 fev. 2023

NIE, S. *et al.* Small molecule TrkB agonist deoxygedunin protects nigrostriatal dopaminergic neurons from 6-OHDA and MPTP induced neurotoxicity in rodents. **Neuropharmacology**, v. 99, p. 448–458, dez. 2015.

NITURE, N. T.; ANSARI, A. A.; NAIK, S. R. Anti-hyperglycemic activity of Rutin in streptozotocin-induced diabetic rats: An effect mediated through cytokines, antioxidants and lipid biomarkers. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, p. 720-727, 2014.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. **Guideline for the Testing of Chemicals – no 421: “Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test”.** 29 jul 2016. Disponível em: <https://www.oecdilibrary.org/docserver/9789264264380en.pdf?expires=1522797677&id=id&accname=guest&checksum=3FD13969A2F3DD5CF0D2D22D7B57B0F7>. Acesso em: 4 maio 2020.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. **Guideline for the Testing of Chemicals – no 423: “Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method”.** 29 dec. 2001.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals. **Guideline for the Testing of Chemicals – Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**, 26 set. 2014. Disponível em: Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test | OECD iLibrary (oecd-ilibrary.org). Acesso em: 24/10/2022

OGUNLADE, B.; ADELAKUN, S. A.; AGIE, J. A. Nutritional supplementation of gallic acid ameliorates Alzheimer-type hippocampal neurodegeneration and

cognitive impairment induced by aluminum chloride exposure in adult Wistar rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 2, p. 651–662, 2020.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 641–650, set. 2010.

OMÓBÒWÁLÉ, T. O. et al. Ameliorative effect of *Azadirachta indica* on sodium fluoride-induced hypertension through improvement of antioxidant defence system and upregulation of extracellular signal regulated kinase 1/2 signaling. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 29, n. 2, p. 155–164, 2018.

OSENI, L. A.; AKWETEY, G. M. An in-vivo evaluation of antiplasmodial activity of aqueous and ethanolic leaf extracts of *Azadirachtha indica* in *Plasmodium berghei* infected balb/c mice. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, p. 1406–1410, 2012.

PATEL, S. M. et al. Potential of neem (*Azadirachta indica* L.) for prevention and treatment of oncologic diseases. **Seminars in Cancer Biology**, v. 40–41, p. 100–115, 2016.

PATIL, P. et al. Antidiabetic activity of alcoholic extract of Neem (*Azadirachta Indica*) root bark. **National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 142, 2013.

PAUL, R.; PRASAD, M.; SAH, N. K. Anticancer biology of *Azadirachta indica* L (neem): A mini review. **Cancer Biology & Therapy**, v. 12, n. 6, p. 467–476, 2011.

PERCY, Samuel R. **Improvement in drying and concentrating liquid substances by atomizing**. Depositante: Samuel R. Percy, US 125406A Concessão: 09 abr 1872

PINGALI, U. et al. Evaluation of the effect of an aqueous extract of *Azadirachta indica* (Neem) leaves and twigs on glycemic control, endothelial dysfunction and systemic inflammation in subjects with type 2 diabetes mellitus – A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 13, p. 4401–4412, nov. 2020.

PLAA, G. L.; CHARBONNEAU, M. Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Testing Methods and Strategies. In: HAYES, A. W.; KRUGER, C. L. (Org.). **Hayes' Principles and Methods of Toxicology**. 0. ed. [s.l.] CRC Press, 2014. p. 1107–1142.

PRINCE, P. S. M.; KAMALAKKANNAN, N. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 20, n. 2, p. 96–102, abr. 2006.

PRIYADARSINI, R. V. *et al.* The neem limonoids azadirachtin and nimbolide induce cell cycle arrest and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (HeLa) cells. **Free Radical Research**, v. 44, n. 6, p. 624–634, jan. 2010.

PURI, H. S. **Neem: the divine tree: *Azadirachta indica***. Amsterdam: Harwood Academic, 2006, v. 5, 166p.

RENGASAMY, P.; PADMANABHAN, R. R. Experimental studies on cervical and lumbar ribs in mouse embryos. **Congenital Anomalies**, v. 44, n. 3, p. 156–171, set. 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

ROLIM, A. *et al.* Validation Assay for Total Flavonoids, as Rutin Equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) Commercial Extract. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 4, p. 1015–1019, 1 jul. 2005.

SALEEM, S. *et al.* A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*: A Comprehensive Review of Azadirachtaindica. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 7, p. 1241–1272, jul. 2018.

SANDHIR, R.; KHURANA, M.; SINGHAL, N. K. Potential benefits of phytochemicals from *Azadirachta indica* against neurological disorders. **Neurochemistry International**, v. 146, p. 1-13, jun. 2021.

SATYANARAYANA, K. *et al.* Molecular approach to identify antidiabetic potential of *Azadirachta indica*. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 6, n. 3, p. 165, 2015.

SCHUMACHER, M. *et al.* Anti-inflammatory, pro-apoptotic, and anti-proliferative effects of a methanolic neem (*Azadirachta indica*) leaf extract are mediated via modulation of the nuclear factor- κ B pathway. **Genes & Nutrition**, v. 6, n. 2, p. 149–160, maio 2011.

SERIANA, I. *et al.* Neem Leaf (*Azadirachta indica* A. Juss) Ethanolic Extract on the Liver and Kidney Function of Rats. **The Scientific World Journal**, v. 2021, p. 1–7, 30 mar. 2021.

SHEKESKEY, P. J.; COOK, W. G.; CABLE, C. G. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 8th ed ed. London Washington (D.C.): Pharmaceutical press American pharmacists association, 2017.

SIKDER, K. *et al.* Quercetin and beta-sitosterol prevent high fat diet induced dyslipidemia and hepatotoxicity in Swiss albino mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 52, n. 1, p. 60–66, jan. 2014.

SILVA, V.D.; NOGUEIRA, R.M.B.; OLIVEIRA, G.I.V.; GIUFRIDA, R. Comparação da indução do *Diabetes mellitus* com aloxana em diferentes doses em ratos Wistar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.35, n.4, suplemento, p. 2463-2470, 2014.

SILVA, V. C. L. DA *et al.* Post-natal development of rats` offspring treated with the ethanol extract of Neem leaves (*Azadirachta indica* A. Juss) during pregnancy and lactation. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 37, n. 2, p. 219, 6 ago. 2015.

SITHISARN, P.; SUPABPHOL, R.; GRITSANAPAN, W. Comparison of Free Radical Scavenging Activity of Siamese Neem Tree (*Azadirachta indica* A. Juss var. *siamensis* Valetton) Leaf Extracts Prepared by Different Methods of Extraction. **Medical Principles and Practice**, v. 15, n. 3, p. 219–222, 2006.

SOARES, D. *et al.* Anti-inflammatory and Antinociceptive Activities of Azadirachtin in Mice. **Planta Medica**, v. 80, n. 08/09, p. 630–636, 28 maio 2014.

SOARES, J. C. M.; COSTA, S. T.; CECIM, M. Níveis glicêmicos e de colesterol em ratos com *Diabetes Mellitus* aloxano induzido, tratados com infusão de *Bauhinia candicans* ou *Syzygium Jambolanum*. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.30, n.1, p.113-118, 2000.

SOARES, L. F. **Microencapsulação por spray drying do extrato das folhas de *Azadirachta indica* A. Juss. MELIACEAE**. Dissertação (Mestrado em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde) Campus Central - Universidade Estadual de Goiás. Anápolis. p. 129. 2020.

SOARES, L. F.; MACHADO, L. C.; SANTOS, E. J. P.; BEZERRA, D. G.; BORGES, L. L.; AMARAL, V. C. S.; PAULA, J. R.; PAULA, J. A. M. Determination and validation of spectrophotometric analytical method for quantification of total flavonoids in the leaves of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) and optimization of the ultrasound-assisted extraction conditions. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 3, e9211326135, 2022.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **DIRETRIZES SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2019-2020**. Disponível em: <<https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/DIRETRIZES-COMPLETA-2019-2020.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2020.

SRIRAKSA, N. *et al.* Cognitive-Enhancing Effect of Quercetin in a Rat Model of Parkinson's Disease Induced by 6-Hydroxydopamine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

SRIVASTAVA, M. K.; RAIZADA, R. B. Assessment of embryo/fetotoxicity and teratogenicity of azadirachtin in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, n. 10, p. 1023–1027, out. 2001.

STARK, C.; STEGER-HARTMANN, T. Nonclinical Safety and Toxicology. *In*: NIELSCH, U.; FUHRMANN, U.; JAROCH, S. (Org). **New Approaches to**

Drug Discovery. Handbook of Experimental Pharmacology. Cham: Springer International Publishing, 2015. v. 232 p. 261–283.

STAZI, A.V. *et al.* Significance of the minor alterations of the axial skeleton in rat fetuses. A short review. **Congenital Anomalies**, v. 32, p. 91-104, 1992.

SU, Y. L. *et al.* Microencapsulation of Radix salvia miltiorrhiza nanoparticles by spray-drying. **Powder Technology**, v. 184, n. 1, p. 114–121, maio 2008.

SUBAPRIYA, R. *et al.* Chemoprotective effects of ethanolic extract of neem leaf against MNNG-induced oxidative stress. **Die Pharmazie**, v. 58, n. 7, p. 512–517, jul. 2003.

SUBAPRIYA, R.; KUMARAGURUPARAN, R.; NAGINI, S. Expression of PCNA, cytokeratin, Bcl-2 and p53 during chemoprevention of hamster buccal pouch carcinogenesis by ethanolic neem (*Azadirachta indica*) leaf extract. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1080–1087, nov. 2006.

SUBAPRIYA, R.; NAGINI, S. Medicinal Properties of Neem Leaves: A Review. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 5, n. 2, p. 149–156, 2005.

SUGANTHY, N. *et al.* Bioactive effects of quercetin in the central nervous system: Focusing on the mechanisms of actions. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 892–908, dez. 2016.

SUN, J. *et al.* Neuroprotective effects of gallic acid against hypoxia/reoxygenation-induced mitochondrial dysfunctions in vitro and cerebral ischemia/reperfusion injury in vivo. **Brain Research**, v. 1589, p. 126–139, nov. 2014.

SUZUKI, T.; HONDA, Y.; MUKASA, Y. Effects of UV-B radiation, cold and desiccation stress on rutin concentration and rutin glucosidase activity in tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*) leaves. **Plant Science**, v. 168, n. 5, p. 1303–1307, maio 2005.

SUZUKI, Y. *et al.* The micronucleus test and erythropoiesis. Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio). **Mutagenesis**, v. 4, n. 6, p. 420–424, 1989.

SZAYNA, M. *et al.* Exendin-4 Decelerates Food Intake, Weight Gain, and Fat Deposition in Zucker Rats. **Endocrinology**, v. 141, n. 6, p. 1936–1941, jun. 2000.

TAKAGI, M. *et al.* Cytotoxic and Melanogenesis-Inhibitory Activities of Limonoids from the Leaves of *Azadirachta indica* (Neem). **Chemistry & Biodiversity**, v. 11, n. 3, p. 451–468, mar. 2014.

TEPONGNING, R. N. *et al.* Hydroethanolic Extracts of *Erigeron floribundus* and *Azadirachta indica* Reduced *Plasmodium berghei* Parasitemia in Balb/c

Mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1–12, 21 out. 2018.

TRIPATHI, A.; SHRIVASTAV, T. G.; CHAUBE, S. K. Aqueous extract of *Azadirachta indica* (neem) leaf induces generation of reactive oxygen species and mitochondria-mediated apoptosis in rat oocytes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, n. 1, p. 15–23, jan. 2012.

TYL, R. W. Commentary on the Role of Maternal Toxicity on Developmental Toxicity: MATERNAL AND DEVELOPMENTAL TOXICITY. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 95, n. 3, p. 262–266, jun. 2012.

VERGALLO, C.; PANZARINI, E.; DINI, L. High performance liquid chromatographic profiling of antioxidant and antidiabetic flavonoids purified from *Azadirachta indica* (neem) leaf ethanolic extract. **Pure and Applied Chemistry**, v. 91, n. 10, p. 1631–1640, 25 out. 2019.

VILELA, J., A.R. **Efeito da utilização de óleo de nim (*Azadirachta indica*) por via dérmica e da moxidectina por via subcutânea na prevenção de infestações artificiais por *Dermatobia hominis* (Linnaeus Jr., 1781) (Diptera: Cuterebridae) em bovinos**. Mestrado em Ciências Veterinárias—Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 13 out. 2008.

VRANOVÁ, E.; COMAN, D.; GRUISSEM, W. Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 665–700, 29 abr. 2013.

WILSON, J. G. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. *In*: WARKANY, J.; WILSON, J.G. (Eds.). **Teratology: Principles and techniques**. Chicago, IL: University of Chicago Press, 1965. p. 262-267.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO monographs on selected medicinal plants**. Geneva: World Health Organization, 1999. 289 p. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42052/9241545178.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 07 fev. 2023

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019**. Geneva: World Health Organization, 2019. 226 p. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312342/9789241515436-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 07 fev. 2023

YADAV, D. K.; BHARITKAR, Y. P.; CHATTERJEE, K.; GHOSH, M.; MONDAL, N. B.; SWARNAKAR, S. Importance of Neem leaf: an insight into its role in combating diseases. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 54, p. 708-718, 2016.

YANG, R.-Z. *et al.* Alanine aminotransferase isoenzymes: Molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. **Hepatology**, v. 49, n. 2, p. 598–607, fev. 2009.

YOSHIDA, Y.; NIKI, E. Antioxidant Effects of Phytosterol and Its Components. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 49, n. 4, p. 277–280, 2003.


ZANOELLO, A. M.; MAZZANTI, C. M.; GINDRI, J. K.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; CECIM, M. Efeito protetor do *Syzygium cumini* contra *Diabetes melittus* induzido por aloxano em ratos. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.21, n.1, p.31-36, 2002.

ZAREIE P.; GHOLAMI M.; AMIRPOUR-NAJAFABADI B.; HOSSEINI S.; SADEGH M. Sodium valproate ameliorates memory impairment and reduces the elevated levels of apoptotic caspases in the hippocampus of diabetic mice. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2018. DOI: 10.1007/s00210-018-1531-3. Acesso em: 02/04/2019.

ZHU, Z. *et al.* Optimization of Spray-Drying Process of Jerusalem artichoke Extract for Inulin Production. **Molecules**, v. 24, n. 9, p. 1674, 29 abr. 2019.

ZIAEE, A. *et al.* Spray drying of pharmaceuticals and biopharmaceuticals: Critical parameters and experimental process optimization approaches. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 127, p. 300–318, jan. 2019.

Anexo 1 – Parecer da Comissão de Ética no Uso em Animais (CEUA) da UEG, parecer n.002/2020




Anápolis, 16 de novembro de 2020.

PARER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 002/2020

I - Finalidade do projeto de pesquisa:
Pesquisa de Mestrado
II - Identificação:
Título do projeto: Eficácia e segurança do extrato seco microencapsulado das folhas de <i>Azadirachta indica</i> A. JUSS (Melíaceae)
Pesquisador Responsável/ Unidade:
Joshua Abádia Márciano de Paula
Pesquisadores Participantes:
Vanessa Cristiane de Santana Amaral; Walter Dias Junior; Carlos Eduardo Lacerda Ramalho; Micaelle Cristina de Oliveira; Diego dos Santos Reis; Danielle Milany Fernandes Silva
Unidade onde será realizado: Universidade Estadual de Goiás: Laboratório de Fitologia e Bioquímica Toxicológica - Unidade Universitária de Ceres e Biotério do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia de Produtos Nativos e Sintéticos - CET.
Data de apresentação a CEUA: 18 de setembro de 2020.
III - Objetivos e justificativa do projeto:

5

PPG Pós-Graduação em Pesquisa e Pós-Graduação
BR 110, Quadra 01, Anápolis - GO
CEP: 73120-900, Anápolis - GO



Objetivos e justificativa descritos pelo autor pesquisador, retirado do documento Ficha de Protocolo.

Objetivo Geral
Avaliar, em modelos animais, a atividade hipoglicemiante e a segurança materno-fetal do extrato seco microencapsulado obtido das folhas de *A. indica*.


Objetivos específicos

- Obter e caracterizar o extrato seco microencapsulado das folhas de *A. indica* - EMFAI;
- Determinar se o extrato seco microencapsulado é capaz de reduzir a glicemia em ratos com diabetes induzido;
- Propor possível mecanismo de ação do efeito hipoglicemiante;
- Avaliar o efeito do tratamento com extrato seco microencapsulado sobre o ganho de massa corporal, consumo de ração e água das ratas durante a prenhez;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos e de desempenho reprodutivo das prolegrávidas;
- Avaliar se haverá ocorrência de alterações histopatológicas no fígado, rins, útero e ovários das prolegrávidas;
- Avaliar os parâmetros morfométricos fetais;
- Avaliar se haverá alterações esqueléticas e viscerais na prole."

Justificativa
Como este projeto de pesquisa é aplicado ao desenvolvimento de produto para a saúde, a avaliação da eficácia e segurança do extrato seco microencapsulado que será produzido seguirá o preconizado pelas agências regulatórias nacionais e internacionais. Nesse contexto, o extrato microencapsulado incorpora tecnologia farmacêutica inexistente nos estudos com *A. indica* destinados a avaliar o efeito anti-diabético e a toxicidade materno-fetal. Tais estudos são fundamentais, pois o produto utilizado destina-se ao desenvolvimento de insumo farmacêutico passível de exploração econômica. O microencapsulamento pode aumentar a estabilidade dos componentes ativos do extrato, conferindo características farmacocinéticas mais adequadas. Além disso, as características tecnológicas e as etapas produtivas são compatíveis com o processo de obtenção de um insumo farmacêutico ativo vegetal. Embora haja estudos destinados a avaliar a atividade do extrato bruto da folha de *A. indica* no diabetes, tais estudos carecem de um detalhamento das etapas do processo produtivo do extrato de forma a permitir a sua escalabilidade e padronização. O extrato a ser utilizado nos ensaios foi elaborado por processo produtivo validável, com observância dos requisitos regulatórios necessários à identificação, caracterização e quantificação do extrato utilizado (BRASIL, 2019). As empresas fabricantes de fitoterápicos apontam dificuldades em encontrar fornecedores nacionais capazes de atender às exigências regulatórias. Por isso, os insumos utilizados em medicamentos fabricados nacionalmente são majoritariamente de origem estrangeira (HASSENCKLEVER *et al.*, 2017). Esse aspecto não só limita o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos como justifica o desinteresse comercial das empresas nas pesquisas realizadas nos centros de pesquisa universitários (HASSENCKLEVER *et al.*, 2017). Tais aspectos sustentam a necessidade de se pesquisar os produtos nativos com um olhar focado nas necessidades da população e do mercado, com observância aos preceitos regulatórios destinados a resguardar a qualidade, segurança e eficácia dos fitoterápicos.

5

PPG Pós-Graduação em Pesquisa e Pós-Graduação
BR 110, Quadra 01, Anápolis - GO
CEP: 73120-900, Anápolis - GO



Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:

Ensaio de efeito hipoglicemiante

A condução da avaliação da atividade hipoglicemiante do EMFAI utilizará 80 Ratos *Rattus norvegicus* machos com 60 dias de idade e pesando cerca 250g, sendo 8 animais por tratamento distribuídos em 5 grupos totalizando 40 animais (AMIRI *et al.*, 2017; CAVALLI *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2018). Contudo o número de animais necessários será maior que 40 devido à eficiência do teste de indução do diabetes estimado em 45%. Dentre os 40 animais necessários para composição dos grupos do estudo, 8 animais serão escolhidos aleatoriamente para compor o grupo controle, de animais saudáveis, os quais não serão submetidos à administração do extrato nem ao processo de indução do diabetes.

Indução do diabetes


Serão utilizados 72 ratos para indução do diabetes, sendo o critério para definição do sucesso do procedimento a glicemia acima de 200mg/dl de sangue. Contudo 20 a 40% dos animais tratados com aloxana intraperitoneal não desenvolvem diabetes (CARVALHO *et al.*, 2003; CAVALLI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2014) e 12 a 15% morrem durante ou após 48h da indução (CARVALHO *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014). Assim ao considerar a soma das porcentagens máxima de animais que não desenvolvem diabetes e que morrem durante o processo de indução, obtém-se uma porcentagem de 45% do total de animais com sucesso na indução. Portanto, para não comprometer o o amostreal final dos tratamentos com animais diabéticos (n=8/tratamento) aplicaremos o processo de indução de diabetes com aloxana em aproximadamente 72 animais, para uma expectativa de obtenção de 33 animais diabéticos viáveis para o experimento (45% do total de animais tratados com aloxana). Caso se obtenha um maior sucesso no processo de indução, todos os animais diabéticos sobreviventes (glicemia > 200mg/dL) serão distribuídos nos tratamentos.

Segus abaixo descrição do cálculo:
N = o número de animais necessário a obtenção de 32 animais diabéticos considerando uma eficiência do processo de indução de 45%.
N x 0,45 = 32
N = 32/0,45 = 71,11 aproximadamente 72 animais
Os tratamentos serão distribuídos da seguinte forma:
Grupo Controle com animais saudáveis sem tratamento (GCST) – 8 animais saudáveis que serão utilizados para a comparação dos parâmetros de polifagia, poliúria e alterações metabólicas (ex: perda de peso);
• Grupo Controle Diabético (GCD) – 8 animais diabéticos que receberão somente o veículo (a ser definido no teste de toxicidade aguda);
• Grupo Diabético + EMFAI (GDE1) - 8 animais diabéticos que receberão o EMFAI na menor concentração/dose (a ser definida no ensaio de toxicidade aguda) de XXmg/Kg -1, Via Oral (gavagem).
• Grupo Diabético + EMFAI (GDE2) - 8 animais diabéticos que receberão o EMFAI na concentração/dose intermediária (a ser definida no ensaio de toxicidade aguda) de XXmg/Kg -1, Via Oral (gavagem).
• Grupo Diabético + EMFAI (GDE3) 8 - animais diabéticos que receberão o EMFAI na dose/concentração mais elevada (a ser definida no ensaio de toxicidade aguda) de XXmg/Kg -1, Via Oral (gavagem).

A definição do tamanho amostral foi realizada utilizando uma calculadora amostral disponível no site

5

PPG Pós-Graduação em Pesquisa e Pós-Graduação
BR 110, Quadra 01, Anápolis - GO
CEP: 73120-900, Anápolis - GO



<http://calculadormostrat.buora.usp.br/ta>, considerando amostra independente plug, comparação entre mais de 2 médias com grupos independentes (ANOVA), $\alpha = 10\%$, $\beta = 80\%$, estimativo de desvio padrão = 11 (maior desvio padrão encontrado em estudos anteriores), mínima diferença a ser detectada = 20.

Ensaio de toxicidade materno fetal

Os protocolos mais utilizados internacionalmente nos estudos de toxicidade pré e pós-natal são baseados nas normas da *Environmental Protection Agency* (EPA, 1996), nas diretrizes propostas pela Agência Reguladora Americana *U.S. Food and Drug Administration* (FDA, 1999) e *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2011, 2016). De acordo com as recomendações gerais descritas em ambos os protocolos, o tamanho ideal da amostra para esses estudos é de 20 fêmeas/grupo. Entretanto, estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (AMARAL; NUNES JR, 2008, 2009; CARDOSO *et al.*, 2017) demonstraram que a utilização de 10 fêmeas/grupo fornece uma amostra representativa e com confiabilidade suficiente para uma análise estatística válida. Ademais, para que se possa avaliar a relação dose-efeito das substâncias a serem testadas, os protocolos experimentais recomendam que, além de um grupo controle exposto ao veículo utilizado, devam ser estudados pelo menos três outros grupos experimentais submetidos ao tratamento com doses estabelecidas logaritmicamente (EPA, 1996; FDA, 1999). Diante do exposto, esse teste será realizado com 4 grupos de animais (n=10/grupo): 1 controle e 3 grupos tratados com o extrato.

Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):

Espécie: *Rattus norvegicus*
Linhagem: Wistar
Idade: 60 a 92 dias
Peso: 200 - 250 g
Quantidade: 86 machos e 40 fêmeas, totalizando 126 animais.

Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:

Instalações: Os animais serão mantidos em caixas de polipropileno (41 cm de comprimento x 34 cm de largura x 16 cm de altura), sendo 3 a 4 animais por gaiolas antes do início dos experimentos. Durante o período de prenhez as fêmeas serão mantidas individualmente nas caixas de polipropileno.


- Temperatura: 22 ± 2°C
- Ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 7:00 h).
- Umidade (55 ± 5%)
- Sistema de exaustão do ar.
- Tipo de cama: maravalhas

Alimentação/hidratação: Os animais se alimentarão de ração comercial da marca Presence® e água filtrada ad libitum.

5

PPG Pós-Graduação em Pesquisa e Pós-Graduação
BR 110, Quadra 01, Anápolis - GO
CEP: 73120-900, Anápolis - GO

<p><input type="checkbox"/> Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos: Grax 2 – Experimentos que causam estresse, desconforto ou dor, de leve Intensidade: Haverá procedimentos cirúrgicos menores, como biópsias, sob anestesia; períodos breves de contenção e imobilidade em animais conscientes; exposição a níveis não letais de compostos químicos que não causem reações adversas graves.</p>
<p><input type="checkbox"/> Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais: Para promover o bem-estar dos animais eles permanecerão acomodados sempre em ambiente limpo, com maravalha, água e ração "ad libitum". O zênur corporal, o peso e o consumo de água e ração dos animais serão avaliados diariamente para análise das condições de saúde e decisão da continuidade ou não do animal nos experimentos, para diminuir a dor e o sofrimento animal, como também para melhorar a qualidade dos resultados experimentais. O procedimento de manejo será realizado por pessoas bem treinadas para a execução dessas técnicas. Método de eutanásia: A uretana será utilizada com a finalidade de anestesiar as fêmeas no teste de toxicidade reprodutiva. Uma vez anestesiadas, será realizada uma incisão na linha alba da região abdominal até o processo xifóide. Na sequência, ocorrerá a abertura da cavidade torácica, procedimento que promoverá a eutanásia dos animais e possibilitará a remoção de órgãos para análise.</p>
<p>Destino do animal: Todos os animais serão eutanasiados. Importante ressaltar que, visando atender aos princípios dos 3 Rs (Substituição, Redução e Aprimoramento, do inglês: "Replacement, Reduction and Refinement") elaborados por Willian Russell e Rex Burch em 1959, os machos utilizados para acasalamento das fêmeas do estudo de toxicidade reprodutiva serão mantidos no biotério como reprodutores enquanto estiverem sexualmente aptos para este fim (aproximadamente 1 ano). Após este período, serão eutanasiados por meio de decapitação com o auxílio de uma guilhotina para roedores. Após a eutanásia, os animais serão embalados em sacos plásticos e acondicionados em freezer no biotério. Posteriormente, as carcaças serão incineradas por uma empresa especializada contratada para este fim (Incinerar Tratamento de Resíduos).</p>
<p>IV – Comentários do relator frente as orientações da CEUA: <input type="checkbox"/> Quanto a documentos: Atende às exigências.</p>

<p><input type="checkbox"/> Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores: Os riscos aos pesquisadores incluem acidentes durante o manuseio dos animais e se caracterizam, principalmente, por mordidas e arranhões. Além disso, pode ocorrer eventual contato com fluidos biológicos (sangue, fezes e urina) e com reagentes durante a preparação do extrato. Para minimizar estes riscos, os alunos envolvidos no estudo, antes de iniciar cada uma das etapas experimentais, receberão treinamento sobre segurança do trabalho e boas práticas laboratoriais na UEG. Ademais, utilizarão equipamentos de proteção individual (EPI) como luva, jaleco, óculos e sapatos fechados. Vale lembrar que os laboratórios em que serão realizadas as pesquisas na UEG possuem capela para exaustão de odores de produtos tóxicos e chuveiro.</p>
<p>V – Parecer da CEUA: Informamos que a <i>Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA</i> da Universidade Estadual de Goiás, após análise, considerou APROVADO, o projeto acima referido, o qual foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes, smj dessa Comissão. O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UEG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) após sua conclusão. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-FIP-UEG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 01/09/2022.</p>
<p>VI – Data da reunião: Reunião realizada no dia: 16 de novembro de 2020.</p>
<p> Prof.ª Dr.ª Roberta Fassini Vice-Coordenadora da CEUA/UEG</p>