



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

HUGO THYARES FONSECA NASCIMENTO PEREIRA DA SILVA

**ANÁLISE DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO DA SEMENTE DE
AZADIRACHTA INDICA EM RATOS WISTAR MACHOS.**

AREIA

2023

HUGO THYARES FONSECA NASCIMENTO PEREIRA DA SILVA

**ANÁLISE DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO DA SEMENTE DE
AZADIRACHTA INDICA EM RATOS WISTAR MACHOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra

Coorientadora: Prof. Dr^a. Luciana D. Rola

Coorientadora: Prof. Ms. Claudenice Rodrigues do Nascimento

AREIA

2023

Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação

S586a Silva, Hugo Thyares Fonseca Nascimento Pereira da.
Análise da toxicidade reprodutiva do extrato da
semente de azadirachta indica em ratos wistar machos /
Hugo Thyares Fonseca Nascimento Pereira da Silva. -
Areia:UFPB/CCA, 2023.
44 f. : il.

Orientação: Ricardo Romão Guerra Guerra.
Coorientação: Luciana Diniz Rola, Claudenice
Rodrigues do Nascimento.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

1. Ciência Animal. 2. Morfometria. 3. Neem. 4.
Toxicidade reprodutiva. I. Guerra, Ricardo Romão. II.
Rola, Luciana Diniz. III. Nascimento, Claudenice
Rodrigues do. IV. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 631/635(043.3)

Elaborado por LUCIANNA SILVESTRE DE CASTRO AZEVEDO - CRB-15/973



HUGO THYARES FONSECA NASCIMENTO PEREIRA DA SILVA

**ANÁLISE DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO EXTRATO DA SEMENTE
DE AZADIRACHTA INDICA EM RATOS WISTAR MACHOS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de Concentração Saúde Animal no Brejo Paraibano.

APROVADA EM 30/12/2022

BANCA EXAMINADORA

Dr. RICARDO ROMÃO GUERRA

UFPB

Orientador

Dr^a. FABÍOLA FIALHO FURTADO GOUVÊA

UFPB

Examinadora

Dr^a. NORMA LÚCIA DE SOUZA ARAÚJO

UFPB

Examinadora

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

HUGO THYARES FONSECA DO NASCIMENTO PEREIRA DA SILVA - Nascido em 14 de setembro de 1994, no município de Recife, estado de Pernambuco. Ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal da Paraíba - UFPB, Campus II, em 2013 e em novembro de 2018, obteve o título de veterinário, pela Universidade Federal da Paraíba - UFPB. Em sua trajetória acadêmica realizou trabalhos nos Laboratórios de Prática e Processamento Histopatológico - UFPB. Foi monitor da Disciplina Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos e Clínica Médica por dois períodos letivos. Participou de projetos de pesquisa na iniciação científica durante o período de três anos, sendo orientado pelo Prof. Ricardo Romão Guerra. Iniciou o curso de mestrado em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCAn) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus II – Areia-PB, em novembro de 2020, sob orientação do Prof.Dr. Ricardo Romão Guerra.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por proporcionar-me saúde, sabedoria, paciência e forças para cumprir mais essa etapa de minha vida. Apesar de muitas dificuldades em cada uma delas, Ele sempre esteve presente agraciando-me com suas bênçãos;

Agradeço à toda minha família, principalmente à minha mãe, Professora Ms. Claudenice Rodrigues do Nascimento, que apesar de todas as dificuldades enfrentadas, sempre acreditou em mim e foi minha maior incentivadora, mostrando-me o caminho da honestidade, simplicidade e humildade, apesar de estar no auge da conclusão do seu doutorado, me ajudou sendo minha co orientadora, não me deixando desistir em meio a tantas tribulações.

Agradeço à minha irmã Delva Thyares Fonseca Lamec que me ajudou na realização das técnicas experimentais.

Agradeço ao meu amigo Natanael Félix da Silva Filho que tanto contribuiu na avaliação das análises hormonais e motilidade das células.

À minha amiga Telma de Sousa Lima que realizou a análise histopatológica das minhas lâminas.

Ao meu orientador Professor Dr. Ricardo Romão Guerra, que acreditou na minha capacidade, ajudou na análise morfométrica do trabalho, leitura e correção da escrita de minha dissertação e a quem sou grato por meu conhecimento na área da histologia adquiridos ainda na minha graduação.

À Professora Dr^a Luciana Diniz Rola que me orientou ainda na fase da elaboração do projeto, com relação a compreensão da importância e da análise da motilidade e vigor dos espermatozoides para a reprodução animal.

Ao professor Dr. Hugo Enrique Medez García por permitir a utilização do seu laboratório e ajudar na realização dos cortes histológicos.

À minha noiva Thais Nayara de Lima Ramos por toda a paciência e cumplicidade durante todo este período difícil você esteve comigo meu amor.

À CAPES pelo recurso financeiro fundamental para o desenvolvimento da pesquisa e também parte de um sonho.

Por fim, só tenho a agradecer a todos aqueles acima citados e outros, que de forma direta ou indireta, contribuíram para essa etapa tão importante de minha vida, a todos vocês, deixo o meu sincero agradecimento.

**“Não é o quanto fazemos, mas quanto amor colocamos naquilo que fazemos.
Não é o quanto damos, mas quanto amor colocamos em dar.” (Madre Teresa de
Calcutá)**

RESUMO

A *Azadirachta indica* A. Juss, popularmente conhecida como NEEM, é uma espécie arbórea nativa da Índia pertencente à família Meliaceae. Atualmente suas folhas, cascas e sementes, vêm sendo utilizadas na fabricação de herbicidas, repelentes, fármacos, cosméticos, entre outros. O presente estudo objetivou avaliar a toxicidade reprodutiva do extrato da semente de Neem em ratos Wistar machos após exposição aguda na dose de 2.000 mg/kg e as possíveis alterações morfofisiológicas causadas na espermatogênese, através de análise espermática, bioquímica hormonal, histopatológica e morfométrica dos ratos tratados, buscando verificar a viabilidade de sua utilização como matéria prima no desenvolvimento de contraceptivo oral. Foram utilizados 16 *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar machos, com idade média de 30 semanas, pesando uma média de 375g \pm 4.3428g. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle e grupo tratado. Cada grupo foi formado por 8 machos. A análise morfométrica dos cortes de epitélio testicular exibiu redução significativa na altura do epitélio e no diâmetro tubular do grupo tratado. O histopatológico dos testículos dos ratos tratados demonstrou contornos irregulares, caracterizados por uma túnica albugínea com variações na espessura do tecido conjuntivo denso, moderadas reentrâncias no parênquima testicular, além de descolamento capsular. No espaço tubular, observou-se graus variados de degeneração e necrose epitelial. Os túbulos seminíferos exibiam aglomerados no lúmen tubular, constatando-se ainda redução nos parâmetros motilidade, vigor e concentração das células no epidídimo. Com relação a morfologia dos espermatozoides, pode-se encontrar (com aumento de 100X) alterações no formato da cabeça, com algumas dessas células apresentando cabeça piriforme, cabeça subdesenvolvida e cauda fortemente dobrada. Com base nas análises, conclui-se que o tratamento com o extrato aquoso da semente de *Azadirachta indica*, por via oral (gavagem) na dose de 2000mg/kg ocasionou alterações negativas no testículo e epidídimo de ratos, constatando a toxicidade reprodutiva do extrato de Neem, podendo o mesmo ser utilizado no estudo e desenvolvimento de medicações contraceptivas para uso animal.

Palavras-Chaves: morfometria; Neem; toxicidade reprodutiva.

ABSTRACT

Azadirachta indica A. Juss, popularly known as NEEM, is a tree species native to India belonging to the Meliaceae family. Currently its leaves, bark and seeds have been used in the manufacture of herbicides, repellents, drugs (of therapeutic function), cosmetics, among others. The present study aimed to evaluate the reproductive toxicity of Neem seed extract in male Wistar rats after acute exposure at a dose of 2,000 mg/kg and the possible morphophysiological changes caused in spermatogenesis, through sperm analysis, hormonal biochemistry, histopathology and morphometrics of rats treated, seeking to verify the viability of its use as raw material in the development of oral contraceptives for animals. Sixteen male Wistar *Rattus norvegicus*, with an average age of 30 weeks, weighing an average of $375\text{g} \pm 4.3428\text{g}$ were used. The animals were divided into two groups: control group and treated group. Each group was formed by 8 males. Morphometric analysis of testicular epithelium sections showed a significant reduction in epithelium height and tubular diameter in the treated group. The histopathology of the testicles of the treated rats showed irregular contours, characterized by a tunica albuginea with variations in the thickness of the dense connective tissue, moderate indentations in the testicular parenchyma, in addition to capsular detachment. In the tubular space, varying degrees of epithelial degeneration and necrosis were observed. The seminiferous tubules exhibited clusters in the tubular lumen, and a reduction in motility, vigor and concentration of cells in the epididymis was also observed. Regarding the morphology of the spermatozoa, one can find (with 100X magnification) changes in the shape of the head, with some of these cells presenting a pear-shaped head, an underdeveloped head and a strongly bent tail. Based on the analyses, it is concluded that the treatment with the aqueous extract of the seed of *Azadirachta indica*, orally (gavage) at a dose of 2000mg/kg caused negative alterations in the testis and epididymis of rats, verifying the reproductive toxicity of the extract of Neem, which can be used in the study and development of contraceptive medications for animal use.

Keywords: morphometry; Neem; reproductive toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Árvore da <i>Azadirachta indica</i>	15
Figura 2-	Estrutura química de Azaditactina extraída da planta <i>Azadirachta indica</i>	16
Figura 3-	Fluxograma experimental.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
FDA	Food and Drugs Administration
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LAPABH	Laboratório de Processamento de Amostras Biológicas
LH	Hormônios luteinizante
NLAB	Laboratório Veterinário de Análises Clínicas
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
Ppm	Partes por milhão

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
2	Capítulo 1- Análise da Toxicidade Reprodutiva do Extrato da Semente de <i>Azadirachta Indica</i> Em Ratos <i>Wistar</i> Machos.....	18
3	INTRODUÇÃO.....	20
4	MATERIAL E MÉTODO.....	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6	CONCLUSÃO	33
	REFERÊNCIAS	35
	ANEXO.....	42

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Neem (*Azadirachta indica*) é uma planta que pertence à família Meliaceae. (SAXENA, 1983) e tem sido extensamente estudada, visando identificar a composição fitoquímica, a biossíntese e a toxicologia. São árvores de grande porte, podendo atingir até 30m de altura e 2,5m de diâmetro. Nativa de todo o subcontinente indiano, é resistente à seca (figura 1).

A árvore do Neem possui folhas verdes durante todo o ano, elas são alternadas, sem pelos e de consistência membranácea, com bordos irregulares, sendo usualmente empregadas no controle de pragas, a exemplo da mosca branca (*Bemisia tabaci*), mosca minadora (*Liomyza sativae*), traça das crucíferas (*Plutella xylostela*) e lagartas em geral. Seus frutos são lisos, de formato elíptico, com aproximadamente 2cm de comprimento de cor amarelada com uma polpa doce envolvendo as sementes (IAC, 2021).

As flores da *Azadirachta* (Figura 1) são numerosas e pequenas, de coloração branca ou creme e reunidas em inflorescências densas, de cerca de 25 cm de comprimento, encontrando-se tanto flores masculinas como hermafroditas na mesma planta (IAC, 2021). As raízes penetram profundamente no solo, o que lhe proporciona uma melhor absorção de nutrientes, proporcionando um desenvolvimento rápido,

A planta é muito conhecida por suas propriedades medicinais e terapêuticas encontradas nas sementes, nas folhas e na casca. A maioria dos componentes da *Azadirachta indica* que já foram caracterizados, pertencem à classe dos terpenos e sendo denominados limonóides, essas substâncias são conhecidas como meliacina (SILVA, 2022).

Dentre os limonóides presentes nas sementes, a azadiractina tem maior importância por ser responsável pela maioria das atividades biológicas dos quais incluem, atividade vermífuga, antibacteriana e cicatrizantes (AZEVEDO et al., 2015).

Figura 1. *Azadirachta indica*



Fonte: (TANJA, 20

A Azadiractina, um tetranortriterpenóide, é o principal princípio ativo encontrado no Neem, sendo responsável pela regulação do crescimento, regulação da fecundidade comprovada em insetos (SCHUMACHER, 2011). A azadiractina (Figura 2), foi isolada pela primeira vez por Butterworth e Morgan, e está intimamente associada à ação supressora de apetite ou inibidora de crescimento em insetos (TANJA, 2022).

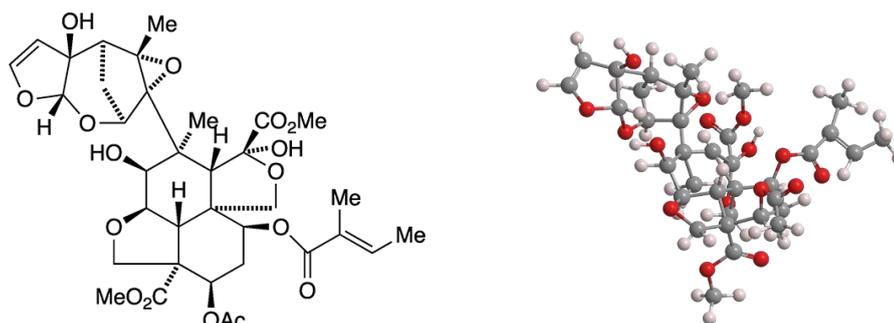


Figura 2. Estrutura química de Azadiractina extraída da planta *Azadirachta indica* (FILHO, 2022)

Na Índia e na África, milhões de pessoas usam pequenos galhos de Neem como escova de dente. Estudos recentes comprovam que infecções odontológicas estão sendo tratadas utilizando-se tradicionalmente componentes isolados de partes do Neem (ARAÚJO et al., 2010).

No Brasil, a planta do Neem vem chamando bastante atenção pois, os inseticidas à base de Neem são produzidos de forma simples em relação aos agrotóxicos, considerados menos poluentes, com baixo poder residual e apresentando menor risco de intoxicação para mamíferos e aves (DA SILVA, 2021).

A utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades, na área veterinária, principalmente na zona rural tem se tornado comum.

segundo Turolla (2006) saber-se que muitas plantas medicinais apresentam substâncias tóxicas, seja por seus próprios componentes, seja pela presença de agentes contaminantes nas preparações.

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada através do Decreto nº 5.813 em 22 de junho de 2006, apresenta nas suas diretrizes o incentivo ao desenvolvimento e à pesquisa no que se refere ao uso de plantas medicinais e fitoterápicos que possam ser disponibilizados com eficácia, segurança e qualidade à população, dando prioridade à biodiversidade do país (BRASIL, 2006; CARVALHO et

al., 2007). Uma vez implementada a política, tornam-se necessários estudos toxicológicos pré-clínicos para oferecer aos pesquisadores segurança em relação às doses em que aparecem efeitos tóxicos em animais de laboratório (DE CASTRO, 2006).

Segundo Cardoso (2018) a *Azadirachta indica* é utilizada popularmente na Nigéria e Índia para fins medicinais há mais de 2.000 anos (AUTA e HASSAN, 2016). Observou-se atividade contraceptiva, diminuindo a motilidade progressiva dos espermatozoides em estudo realizado por Sharma et al. (1996) com o óleo das sementes de Neem em diferentes concentrações, O extrato da folha de Neem também foi avaliado por seu efeito antidiabético. DHOLI et al. (2011), em seu estudo confirmaram que ratos diabéticos tratados com extrato de Neem (250 mg/kg) exibiram níveis de glicose significativamente menores em comparação ao grupo controle. AKTER (2013), sugeriu que extratos de folhas de *Azadirachta indica* e *Andrographis paniculata* têm atividade antidiabética significativa e podem ser uma fonte potencial para o tratamento de diabetes mellitus.

A idade de reprodução de um rato é de cerca e 50 dias em ambos os sexos, embora as fêmeas possam apresentar seu primeiro cio entre 25 e 40 dias. O processo de espermiogênese varia de acordo com a espécie, embora em média cubra de uma a três semanas. Em experimentos realizados em ratos, o processo de formação de espermatozoides leva 34,5 dias (VASILIAUSHA, 2012).

Sathiyaraj, e colaboradores (2010), descreveram em seu trabalho a diminuição significativa nos pesos dos testículos e epidídimos de ratos Wistar, quando administrado o extrato aquoso de folhas de Neem por gavagem, nas doses de 250 mg/kg e 350 mg/kg, respectivamente, durante 30 dias.

Em estudos realizados com o extrato aquoso das cinzas da madeira fresca de Neem administrado via oral em ratos Wistar machos, por Auta e Hassan (2016), foi observado que a motilidade dos espermatozoides dos grupos tratados diminuiu ao passo que a concentração da dose do extrato aumentava.

Ojewale, et al. (2014) por sua vez, verificou que o extrato etanólico das raízes de *Pseudocedrela kotschy*, também membro da família Meliaceae, administrado via oral (gavagem) dose única em camundongos Swiss macho, não apresentou nenhum

efeito no sentido de prejudicar a integridade histológica do epitélio germinativo dos animais em nenhuma das doses utilizadas.

Lisanti, et al. (2016) ao avaliar o extrato aquoso de sementes e folhas de Neem (*Azadirachta indica*), constatou que a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides sofreram uma diminuição em comparação com o grupo controle depois da administração das doses 2,5 e 5,0 mg/kg por um período contínuo de 36 dias, por gavagem.

Segundo Katte et al. (2018), ao ministrar extrato aquoso de Neem nas concentrações 0.5, 1.0, 1.5, 2.0mm/ml *in vitro* nas células germinativas de ratos Wistar, constatou-se que nas duas maiores doses ocorreram danos à motilidade e viabilidade dessas células. Shaikh (2009) em seus estudos observou que à nível de microscopia óptica, que os cortes dos ovários de ratas tratadas com óleo de Neem revelaram diminuição do número de folículos maduros e alterações significativas nos níveis de hormônios reprodutivos.

Assim sendo, presente estudo objetivou avaliar a toxicidade reprodutiva do extrato aquoso da semente de Neem em ratos Wistar machos após exposição aguda na dose de 2.000 mg/kg e as possíveis alterações morfofisiológicas causadas na espermatogênese, por análise espermática, bioquímica hormonal, histopatológica e morfométrica dos ratos tratados, buscando verificar a viabilidade de sua utilização como matéria prima no desenvolvimento de contraceptivo oral para animais. Figura 3.

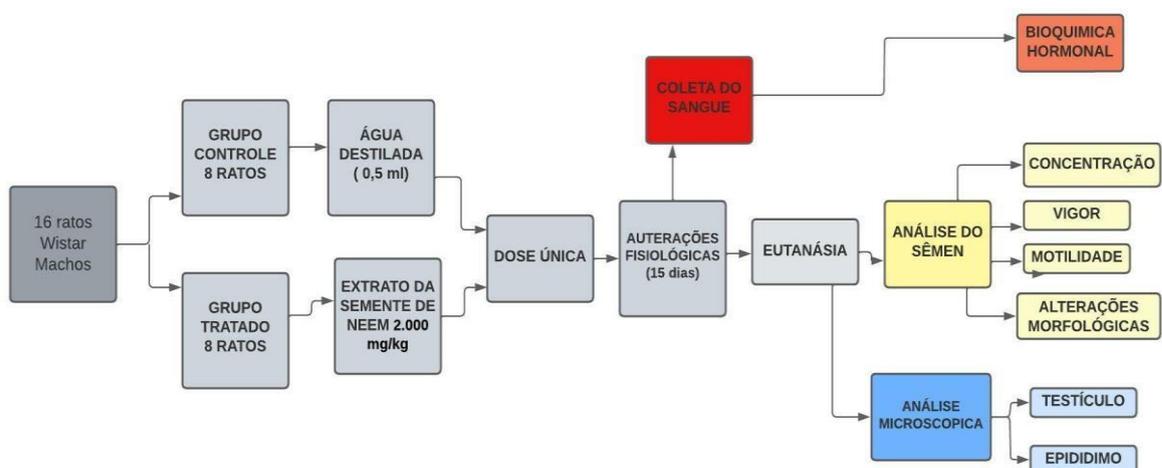


Figura 3. Fluxograma experimental. Fonte: o autor.

2 Capítulo 1 - “Análise da Toxicidade Reprodutiva do Extrato da Semente de *Azadirachta Indica* Em Ratos Wistar Machos”

Este artigo foi submetido à Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Análise da Toxicidade Reprodutiva do Extrato da Semente de *Azadirachta Indica* Em Ratos Wistar Machos

Hugo Thyares Fonseca do Nascimento¹ Claudenice Rodrigues do Nascimento²
Delva Thyares Fonseca Lamec³ Luciana Diniz Rola⁴ Natanael Félix da Silva Filho⁵
Telma de Sousa Lima⁶ Ricardo Romão Guerra⁷.

^{1,3,4,5} Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 12, Rod. Pb-079, Areia - PB, Brasil, CEP 58397-000, hugothyares4@gmail.com

² Escola Técnica de Saúde da UFPB, Centro Profissional e Tecnológico, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Castelo Branco, João Pessoa PB, CEP 58000-000 claudenice.ufpb@academico.com.br

RESUMO

A *Azadirachta indica* A. Juss, popularmente conhecida como NEEM, é uma espécie arbórea nativa da Índia pertencente à família Meliaceae. Atualmente suas folhas, cascas e sementes, vêm sendo utilizadas na fabricação de herbicidas, repelentes, fármacos (de função terapêutica), cosméticos, entre outros. O presente estudo objetivou avaliar a toxicidade reprodutiva do extrato da semente de Neem em ratos Wistar machos após exposição aguda na dose de 2.000 mg/kg e as possíveis alterações morfofisiológicas causadas na espermatogênese, através de análise espermática, bioquímica hormonal, histopatológica e morfométrica dos ratos tratados, buscando verificar a viabilidade de sua utilização como matéria prima no desenvolvimento de contraceptivo oral para animais. Foram utilizados 16 *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar machos, com idade média de 30 semanas, pesando uma média de $375g \pm 4.3428g$. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle e grupo tratado. Cada grupo foi formado por 8 machos. A análise morfométrica dos cortes de epitélio testicular exibiu redução significativa na altura do epitélio e no diâmetro tubular do grupo tratado. O histopatológico dos testículos dos ratos tratados demonstrou contornos irregulares, caracterizados por uma túnica albugínea com variações na espessura do tecido conjuntivo denso, moderadas reentrâncias no parênquima testicular, além de descolamento capsular. No espaço tubular, observou-se graus variados de degeneração e necrose epitelial. Os túbulos seminíferos exibiam espermatozoides anucleados aglomerados no lúmen tubular, constatando-se ainda redução nos parâmetros motilidade, vigor e concentração das células. Com relação a morfologia dos espermatozoides, pode-se encontrar alterações no formato da cabeça, com algumas dessas células apresentando cabeça piriforme, cabeça subdesenvolvida e cauda fortemente dobrada. Com base nas análises, conclui-se que o tratamento com o extrato aquoso da semente de *Azadirachta indica*, por via oral (gavagem) na dose de 2000mg/kg ocasionou alterações negativas no sistema reprodutor masculino de ratos, constatando a toxicidade reprodutiva do extrato de Neem, podendo o mesmo ser utilizado no estudo e desenvolvimento de medicações contraceptivas para uso animal.

Palavras-Chave: morfometria, Neem, toxicidade reprodutiva.

ABSTRACT

Azadirachta indica A. Juss, popularly known as NEEM, is a tree species native to India belonging to the Meliaceae family. Currently its leaves, bark and seeds have been used in the manufacture of herbicides, repellents, drugs (of therapeutic function), cosmetics, among others. The present study aimed to evaluate the reproductive toxicity of Neem seed extract in male Wistar rats after acute exposure at a dose of 2,000 mg/kg and the possible morphophysiological changes caused in spermatogenesis, through sperm analysis, hormonal biochemistry, histopathology and morphometrics of rats treated, seeking to verify the viability of its use as raw material in the development of oral contraceptives for animals. Sixteen male Wistar *Rattus norvegicus*, with an average age of 30 weeks, weighing an average of $375\text{g} \pm 4.3428\text{g}$ were used. The animals were divided into two groups: control group and treated group. Each group was formed by 8 males. Morphometric analysis of testicular epithelium sections showed a significant reduction in epithelium height and tubular diameter in the treated group. The histopathology of the testicles of the treated rats showed irregular contours, characterized by a tunica albuginea with variations in the thickness of the dense connective tissue, moderate indentations in the testicular parenchyma, in addition to capsular detachment. In the tubular space, varying degrees of epithelial degeneration and necrosis were observed. The seminiferous tubules exhibited clusters in the tubular lumen, and a reduction in motility, vigor and concentration of cells in the epididymis was also observed. Regarding the morphology of the spermatozoa, one can find (with 100X magnification) changes in the shape of the head, with some of these cells presenting a pear-shaped head, an underdeveloped head and a strongly bent tail. Based on the analyses, it is concluded that the treatment with the aqueous extract of the seed of *Azadirachta indica*, orally (gavage) at a dose of 2000mg/kg caused negative alterations in the testis and epididymis of rats, verifying the reproductive toxicity of the extract of Neem, which can be used in the study and development of contraceptive medications for animal use.

Keywords: morphometry, Neem, reproductive toxicity.

3 INTRODUÇÃO

A *Azadirachta indica*, popularmente conhecida como Neem é uma árvore perene nativa da Índia pertencente à família Meliaceae (BRAGA, 2022), tem sido usada por milhares de anos em sistemas tradicionais de medicina (CARDOSO, 2022). Das várias partes do Neem, incluindo folhas, cascas, sementes, flores, frutos e raízes, diversos compostos de fitoquímicos com diferentes atributos biológicos e farmacológicos, como *azadiractina*, *nimbolida*, podem ser extraídos (LIMA et al., 2022).

Devido às suas características terapêuticas, a árvore de Neem também é conhecida, especialmente na Índia, como “farmácia da aldeia” sendo declarada pelas Nações Unidas como “A árvore do século” (KUMAR, 2013). O Neem é característico de clima tropical, seu florescimento é dos meses de fevereiro a maio sendo que seus frutos amadurecem de junho a agosto em área de ocorrência natural (CARDOSO, 2022). Trata-se de uma planta que propaga com facilidade, tanto sexualmente quanto vegetativamente, podendo ser plantada por meio de sementes, mudas, árvores novas, brotos de raiz ou tecido de cultura (PAUL, 2011).

O Neem possui compostos limonóides como a azadiractina, salanina, melantriol e nimbina, assim como outras meliaceae. Muitos outros compostos ativos podem ser extraídos das diferentes partes da árvore do Neem incluindo tetraterpenóides, carotenóides, compostos fenólicos, cetonas e esteróides (SALEEM et al., 2018). De acordo com Saleem (2018), tais compostos apresentam baixa toxicidade aos vertebrados. Dentre os mais de 40 terpenóides já identificados na planta, a azadiractina é o composto mais eficiente.

A azadiractina é uma molécula muito extensa e ainda não pode ser sintetizada, sendo assim todos os produtos que a contém são produzidos por extração da planta (SILVA, 2010). De acordo com Auta e Hassan (2016) existem relatos de que a planta Neem (*Azadirachta indica*) a mais de 2.000 anos vem sendo utilizada popularmente na Nigéria e Índia para finalidades medicinais.

Em estudos realizados com o extrato aquoso das cinzas da madeira fresca de Neem administrado via oral por 35 dias em ratos Wistar machos, foi observado que a motilidade dos espermatozoides dos animais dos grupos tratados diminuiu ao passo que a concentração da dose do extrato das cinzas aumentava (Katte et al., 2018).

Em estudos de Auta e Hassan (2016) pode-se constatar através da análise que os animais que receberam a menor dose (5 mg/kg) apresentaram resultados dentro da normalidade, apresentando os túbulos seminíferos com morfologia normal e presença de células espermatogênicas, os que receberam a dose de concentração 50 mg/kg apresentaram espessamento na túnica albugínea e alguns túbulos seminíferos sem conteúdo celular ou apresentando processo de necrose, já na dose de 100 mg/kg os túbulos seminíferos apresentam contornos irregulares e diminuição das células espermatogênicas.

Os efeitos toxicológicos de uma determinada substância sobre a prole é alvo do estudo da toxicologia reprodutiva. A *Food and Drugs Administration* (FDA) preconiza a realização de testes de toxicidade reprodutiva para estudar e conhecer os efeitos de uma substância química sobre o processo de reprodução dos mamíferos. Tais estudos, geralmente, compreendem a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal e após o nascimento e, continuamente até sua maturação sexual, dependendo do protocolo experimental (SILVA LIMA, 2014).

Os agentes químicos quanto aos seus efeitos adversos sobre o ciclo reprodutivo são agrupados em duas categorias: Substâncias que agem na prole no desenvolvimento intra-uterino; Substâncias que alteram as capacidade reprodutivas do indivíduo (machos ou fêmeas) (LEMONICA, 2008).

Lisanti, et al. (2016) ao avaliar o extrato aquoso de sementes e folhas de Neem (*Azadirachta indica*), verificou diminuição da motilidade e a viabilidade dos espermatozoides quando comparada ao grupo controle nas doses 2,5 e 5,0 mg/kg por 36 dias, via oral.

Produtos à base de óleo de Neem têm demonstrado efeitos antifertilidade, em parâmetros biológicos de *Mahanarva fimbriolata* (Hemiptera: Cercopidae). Os adultos da cigarrinha foram mantidos em gaiolas sobre plantas de cana-de-açúcar pulverizadas, na base, com uma dose máxima recomendada comercialmente para a cultura (3 litros/ha) (GARCIA et al., 2019).

Foi constatada nesse experimento a redução na longevidade dos espécimes, independentemente do sexo, em comparação com o grupo controle. Os machos expostos ao extrato, tiveram redução na longevidade de aproximadamente 50%, enquanto para as fêmeas apresentaram redução de 55-60% na longevidade. A

fecundidade, por sua vez, foi reduzida em 75-80%. Houve observação de alterações morfológicas e fisiológicas dos ovos de cerca de 9% GARCIA et al., 2019).

A idade de reprodução de um rato é de cerca e 50 dias em ambos os sexos, embora as fêmeas possam apresentar seu primeiro cio entre 25 e 40 dias. O processo de espermiogênese varia de acordo com a espécie, embora em média cubra de uma a três semanas. Em experimentos realizados em ratos, o processo de formação de espermatozoides leva 34,5 dias (VASILIAUSHA, 2012).

Sendo assim, o presente trabalho objetivou avaliar a toxicidade reprodutiva aguda do extrato da semente de Neem em ratos Wistar machos após exposição em doses de 2.000 miligramas por quilo através da bioquímica hormonal, análise espermática, histopatológica e morfométrica dos ratos tratados, para verificar a possibilidade do uso da referida planta como contraceptivo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Histologia Animal do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e está de acordo com os princípios éticos e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB (Certidão de aprovação nº 4875230221). A análise hormonal, avaliação de motilidade, e vigor foi realizada no laboratório NLAB. O processamento histológico do testículo e epidídimo foi realizado no Laboratório de Prática e Processamento Histopatológico – LPPH/DMORF/CCS e sua posterior análise foi realizada no laboratório da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE .

Foram utilizados 16 *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar machos, com idade média de 30 semanas (adultos jovens), pesando em média $375g \pm 4.3428g$. Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle e grupo tratado. Cada grupo foi formado por 8 animais, sendo todos machos. Eles foram alojados em caixas de polietileno em condições controladas de laboratório (12h ciclo claro/escuro, temperatura: 22 ± 2 °C) e com um período de aclimatação de 7 dias antes do experimento. Ao grupo controle foi administrado o veículo de diluição do extrato, a água. Já o grupo tratado, foi submetido à dose única de 2000 mg/kg do extrato aquoso da semente de *Azadirachta indica*, por via oral (gavagem). Todos os animais receberam ração (pellets) e água *ad libitum*.

Para obtenção das sementes e preparo do extrato aquoso, foram coletados frutos maduros de Neem em plantas pertencentes ao Engenho Patrimônio no município de Condado - Pernambuco (Latitude: 7° 35' 34" Sul, Longitude: 35° 6' 12" Oeste e 125 m de altitude).

As sementes foram extraídas, retirando-se a casca e a polpa dos frutos, e posteriormente secas à sombra e sob temperatura ambiente. Após a secagem, as sementes foram levadas para o LAPAB, Laboratório de Pesquisas Aplicadas à Biofábrica do CETENE/PE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste), onde foram trituradas em moinho ajustável até a obtenção do pó conforme as regras para análise de sementes (BRASÍLIA, 2009).

O mesmo foi mantido em temperatura ambiente e no momento do uso, pesado e dissolvido em água (HARAND, 2016). Foram adicionados 100ml de água destilada à 50g do extrato, sendo a mistura mantida em repouso por 24 horas, em ambiente escuro, para extração das substâncias bioativas. A mistura foi filtrada em tecido voal fino antes da administração. Para o preparo do extrato, seguiu-se a metodologia descrita por GONÇALVES e BLEICHER (2006) e COSTA et al. (2016).

Os protocolos experimentais foram baseados na RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, que dispõe sobre o registro de produtos fitoterápicos na Instrução Normativa nº4, de 18 de junho de 2014 (ANVISA, 2014). Todos os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba.

Após as administrações (hora zero) os animais foram avaliados nos intervalos: 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos, para detectar quaisquer sinais de toxicidade e mudanças no comportamento, tais como: piloereção, diarreia, salivação excessiva, redução na locomoção e mortalidade. Diariamente, foram avaliados o consumo de água e de ração. A partir do início do tratamento os animais foram pesados todos os dias, para avaliar se haveria alteração de peso.

Foram coletadas amostras de sangue de todos os animais após 14 dias da administração do extrato, obtidas por meio da punção da veia caudal, seguindo as diretrizes do CONCEA. Para a análise hormonal foram quantificados os níveis de testosterona total e dos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) por

quimioluminescência. As análises foram realizadas pelo Laboratório Veterinário de Análises Clínicas (NLab).

No 14^o dia, após administração, os animais foram anestesiados e realizadas pequenas incisões na cauda do epidídimo direito com auxílio de agulha hipodérmica para obtenção do sêmen. O material foi imediatamente colocado em uma gota de solução salina (50µl) previamente preparada em uma placa de Petri colocada sobre uma placa aquecida (37°C).

Para a avaliação da motilidade, o material coletado do epidídimo esquerdo foi então colocado em placa de petri contendo 200µl de PBS na temperatura de 37^o C controlado com utilização de banho maria, a fim de limitar os efeitos deletério de pH ou alterações de temperatura, evitando alterações na motilidade do espermatozoide. A mistura foi cuidadosamente homogeneizada, seguida da retirada de 10 microlitros o qual foi colocado em lâmina e coberto com lamínula e levado ao microscópio para análise do vigor e motilidade.

Em seguida, com o auxílio de uma pipeta automática (Eppendorf®), 20µl desta solução foram retirados e diluídos em 100µl de água destilada e levados para centrifugação a 2.000rpm por 5 minutos. Logo após foi coletado o sobrenadante diluído em soro fisiológico e homogeneizado cuidadosamente. Após a homogeneização uma gota da solução foi retirada, realizada a distensão em lâmina histológica e executada a coloração com o kit Panótico Rápido para a efetuar a avaliação morfológicas das células. O restante da solução foi fixado em formol a 10% neutralizado e armazenado para realizar a análise da concentração espermática em câmara de Neubauer.

Os animais foram então eutanasiados, através da técnica de deslocamento cervical, sob anestesia com a utilização de cetamina (225mg/kg) e xilazina (30mg/kg). Após a eutanásia, os testículos e epidídimos, foram retirados e lavados com solução salina NaCl 0,9%. Em seguida realizou-se a avaliação macroscópica e pesagem dos mesmos em balança calibrada.

A análise histopatológica foi realizada a partir de fragmentos isolados dos testículos e epidídimo, dos grupos tratado e controle. Com posterior fixação em formol

a 10%, neutralizado durante 24 horas em seguida lavados em água corrente para a retirada de todo resíduo do fixador.

Após fixadas, as amostras foram clivadas e acondicionadas em cápsulas histológicas e submetidas ao processamento overnight em histotécnico (Leica® modelo RM 2145), sendo desidratadas em doses crescentes de álcool etílico a 70, 80 e 90%, diafanizadas em xilol e infiltradas com parafina histológica.

Realizou-se a inclusão do material em parafina e os cortes histológicos com uma espessura de 5µm foram efetuados no micrótomo rotativo RM2125 RTS (Leica Biosystems). Os cortes foram dispostos em lâmina de vidro de 75 x 25 mm³, realizado dois níveis de corte para cada área de estudo, corados com hematoxilina-eosina e montados em bálsamo do Canadá, para proceder a avaliação de alterações teciduais em microscopia óptica.

Para a histopatologia do epidídimo, seções longitudinais do órgão foram analisadas quanto à densidade espermática no interior do túbulo e classificadas como hipoespermia moderada (+++), hipoespermia discreta (++) e densidade espermática normal (+). A presença de alterações no epidídimo e testículo tais como esfoliação de células germinativas, vacuolização tubular, infiltrados inflamatório, granulomas, necrose, edema e túbulos com redução do diâmetro e desorganização celular foram descritos (LANNING, 2002).

No testículo foi realizada a verificação de alterações histopatológicas, utilizando-se de 10 túbulos seminíferos em cada lâmina (2 lâminas por animal). Esse método foi originalmente proposto para avaliar a espermatogênese em testículo humano (JOHNSEN'S, 1970), mas atualmente também é utilizado para avaliá-la em testículo de ratos (KANTER, 2010).

A avaliação morfométrica testicular foi realizada com base na análise das micrografias de cada grupo. As imagens foram capturadas por meio do microscópio Olympus BX53F (Tokyo, Japão) acoplado a uma câmera fotográfica digital (Olympus DP 73), com auxílio do software cellSens Dimension, utilizando a objetiva de 40X.

Foram mensurados aleatoriamente 100 túbulos seminíferos por animal. Foram obtidos cortes testiculares não seriados, evitando assim análise em duplicidade de

uma mesma área. Foi mensurado diâmetro dos túbulos, lúmen tubular, altura do epitélio seminífero. Todos os parâmetros foram mensurados de forma individual e em seguida calculada a média ponderada de cada grupo.

Após a eutanásia e realização dos procedimentos experimentais, os animais foram acondicionados em sacos de material biológicos e serão destinados ao abrigo provisório de material biológico do IPeFarm para posterior recolhimento da empresa responsável pela coleta de material de risco biológico e infectante da UFPB, a qual incinerará os materiais biológicos.

Utilizou-se o software R statistic nas análises. Realizou-se o Teste T para comparar os grupos controle e tratado . Em seguida realizou-se o Teste de Shapiro Wilk para investigação da normalidade dos dados e o Teste de Levene para obter a variância, essas investigações são para atender ao requisito do Teste T.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação Hormonal

Para verificar se as médias dos grupos são iguais, foi aplicado o Teste de Shapiro Wilk (para confirmar a normalidade) (Tabela 1). Observa-se que os dados do controle e o tratado para hormônio Testosterona apresentaram normalidade, com o p-valor de $\alpha > 0.05$.

Tabela 1: Teste de Shapiro Wilk para testar a normalidade das variáveis LH, FSH e Testosterona para o nível de significância de 0,05 em ratos Wistar machos controles e tratamento com extrato de Neem a 2000mg/Kg

P-valor Shapiro Wilker	
Testosterona controle	0.9769*
Testosterona tratamento	0.8426*
LH Controle	0.6816*
LH tratamento	0.6713*
FSH Controle	0.291*
FSH tratamento	0.586

*Verificação de normalidade dos dados.

Tabela 2: Valores dos parâmetros hormonais em ratos Wistar machos controles e tratamento com extrato de Neem a 2000mg/Kg.

Grupos	Variáveis								
	Hormônio Luteinizante			Hormônio Folículo Estimulante			Testosterona		
	Média	desvio padrão	P-valor	Média	desvio padrão	P-valor	Média	desvio padrão	P-valor
Controle	1.33mU l/ml	±0,07	0,6266	1.59 mUI/ml*	0,35	0,006**	34.54n g/dl	±1.74	0,6453
Tratado	1.37mU l/ml*	±0,21		1.11 mUI/ml	0,11		35.08n g/dl*	±2.80	

* Maior média. **P-valor significativo.

Avaliação da Testosterona

A Testosterona é o mais importante hormônio na produção de espermatozoides. Níveis mais baixos de testosterona podem resultar em atraso na maturação dessas células (SADLER, 2013). Observou-se que o grupo controle e o grupo tratado apresentaram mediana com valores próximos de testosterona (Grupo controle com média = 34,54 ng/dl ±1,74 ng/dl e o grupo tratamento com média = 35.08 ng/dl ±2,80 ng/dl) demonstrando um aumento numérico no grupo tratado, porém não houve diferença estatística entre os grupos. A Figura 1 evidencia a simetria entre os dois grupos. A Tabela 2 demonstra os valores encontrados.

Em trabalho realizado por Brito (2013) a testosterona plasmática dos animais submetidos aos tratamentos com extrato da folha de Neem, não sofreu alteração com relação aos animais controle, corroborando nosso trabalho.

Por sua vez, Shaik et al. (2009) em seu trabalho, observaram que a concentração de testosterona foi menor que a do grupo de animais controle, porém sem significância estatística.

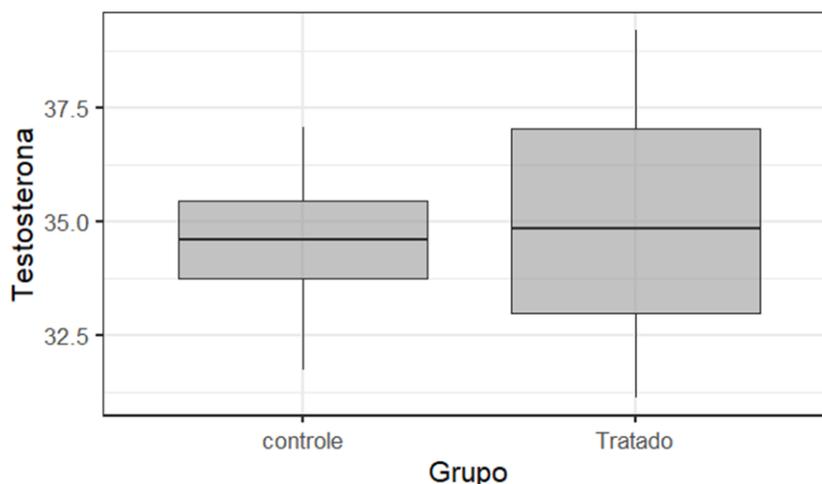


Figura 1: Box Plot dos grupos controle e tratado segundo o hormônio Testosterona em ratos Wistar machos controles e tratamento com extrato de Neem a 2000mg/Kg.

Avaliação do LH

Em machos o Hormônio Luteinizante (LH) é responsável por estimular as células intersticiais (Leydig) encontradas ao lado dos túbulos seminíferos do testículo, sendo responsáveis pela produção de testosterona (Góes, 2018). No presente trabalho observou-se que o grupo controle apresentou níveis de LH mais baixo que o grupo tratado.

Foi aplicado o pressuposto de normalidade, o qual confirmou-se que os dados se comportam como distribuição normal segundo p-valor do Teste de Shapiro Wilker que resultou em 0.6816 para o grupo controle e 0,06 para o grupo tratado, conforme evidenciado na tabela 1.

Para o pressuposto da homogeneidade entre as variâncias, o teste de Levene resultou no p-valor = 0,1175, indicando não haver diferenças entre as variâncias. Ao aplicar o teste T observou-se que para o LH as médias do grupo controle e do grupo tratado são iguais, p-valor = 0.6266.

A concentração sérica média de LH em ratos machos controle foi de $1.33 \pm 0,07$ (mUI/ml) e em ratos tratados com o extrato da semente de Neem foi de $1.37 \pm 0,21$ (mUI/ml). Porém, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos níveis de LH, em machos tratados (Tabela 2 e Figura 2).

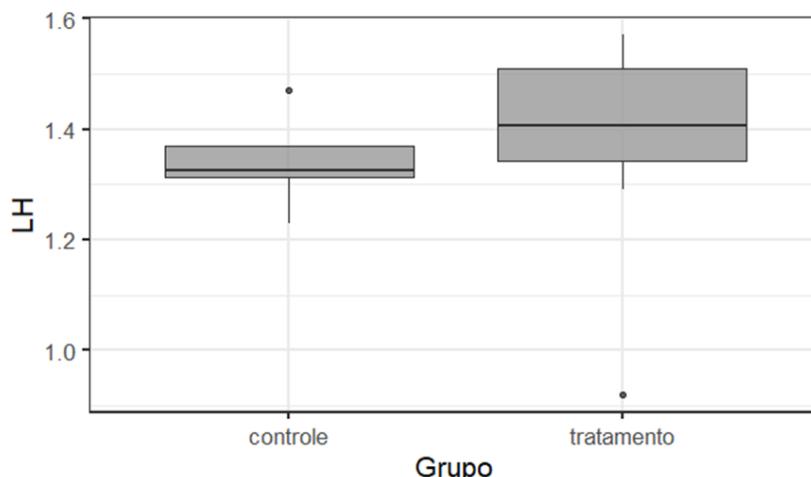


Figura 2: Box Plot para os valores do hormônio Luteinizante dos grupos de ratos Wistar controle e tratado com extrato de Neem a 2000mg/Kg.

Shaikh et al. (2009) em sua pesquisa com fêmeas em idade reprodutiva verificaram que óleo de Neem modifica a estrutura dos ovários, altera a fertilidade e contribui para o aumento dos níveis séricos do FSH, além de reduzir os teores séricos de LH e progesterona, produzindo assim uma provável esterilidade, porém esse resultado encontrado não foi significativo.

Avaliação do FSH

Nos machos o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) atua nas células germinativas nos túbulos seminíferos do testículo sendo responsável pela espermatogênese até o estágio de espermátócito secundário, posteriormente andrógenos do testículo mantém os estágios finais da espermatogênese (Góes, 2018). A concentração sérica média de FSH em ratos machos tratados com foi de $1.11 \pm 0,11$ (lu/L), enquanto a concentração de FSH em ratos controle foi de $1.59 \pm 0,35$ (lu/L). O nível de FSH no grupo tratado apresentou-se significativamente inferior ao controle conforme evidenciado na Figura 3.

Por sua vez, Raji et al. (2013), fazendo uso da administração intraperitoneal de extrato etanólico da casca do caule do Neem, relataram que não houve alteração no nível de FSH.

Em seu estudo, Shaikh (2017), destacou que no tratamento com baixas doses,

os níveis hormonais não mostraram nenhuma alteração significativa. No entanto, em altas doses (1,2 ml/animal) verificou-se uma diminuição, embora estatisticamente não significativa nos níveis de FSH.

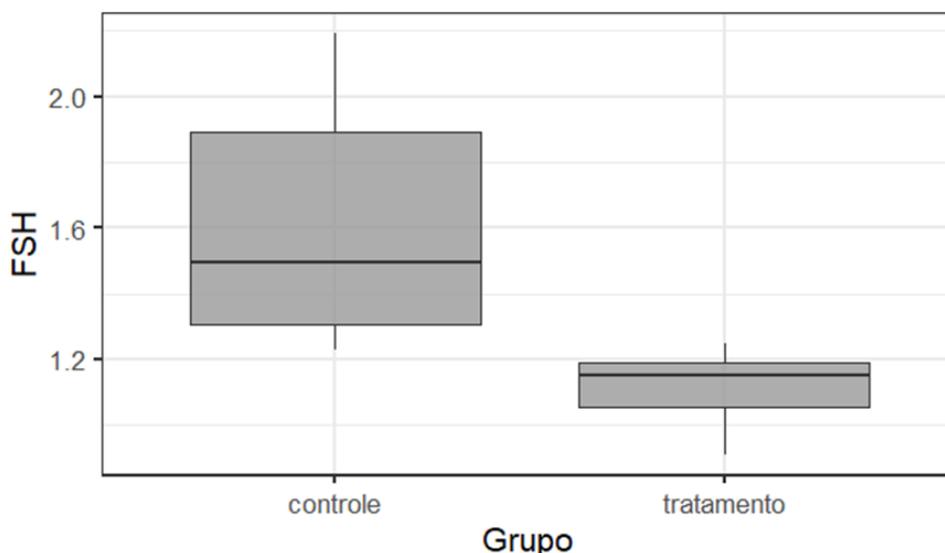


Figura 3: Box Plot para os valores do hormônio Foliculo Estimulante dos grupos de ratos Wistar controle e tratado com extrato de Neem a 2000mg/Kg.

MOTILIDADE, VIGOR E CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA

A motilidade e vigor juntamente com a concentração espermática e morfologia das células reprodutivas são parâmetros importantes com relação ao sucesso reprodutivo. Ao analisar esses parâmetros, a presente pesquisa pode verificar redução da motilidade, vigor e concentração dos espermatozoides no grupo tratado com extrato de Neem a 2000mg/Kg, com significância (Tabela 3).

Com relação a morfologia dos espermatozoides, pode-se encontrar alterações no formato da cabeça, com algumas dessas células apresentando cabeça piriforme, cabeça subdesenvolvida e cauda fortemente dobrada. Para os valores da média de células com caudas fortemente dobradas os valores encontrados apresentaram significância estatística. Contudo não se constatou significância estatística em relação a existência de células com cabeça piriforme. Todavia, o grupo tratado apresentou média de alterações maior que o grupo controle (Tabela 3).

Por sua vez, dados do trabalho de Góis (2019), administrando semente de

Neem na alimentação de codornas machos na proporção de 40% e 50% no período de 60 dias, demonstrou valores médios do volume seminal, concentração espermática, motilidade espermática e vigor significativamente reduzidos.

Tabela 3: Comparação das medidas descritivas da avaliação morfofisiológicas: motilidade, vigor, concentração espermática, morfologia de cabeça e calda de espermatozoides de ratos Wistar tratados com extrato de Neem a 200mg/Kg.

	GRUPO	N	Média	Desvio Padrão	P-valor do Teste Mann Whitney
Motilidade Espermática	Controle	8	92.5**	4.63**	0.0004463*
	tratado	8	71.5**	6.41**	
Vigor	Controle	8	5***	0.00***	0.0002156*
	tratado	8	3.5***	0.744***	
Concentração Espermática	Controle	8	2.49 (milhões /ml)	0.035 (milhões /ml)	0.02474*
	Tratado	8	2.31 (milhões /ml)	0.064 (milhões /ml)	
Cabeça Piriforme	Controle	8	0.00625%	0.0074%	0.137
	Tratado	8	0.02375%	0.022%	
Cauda Subdesenvolvida	Controle	8	0.00%	0.00%	0.0031*
	Tratado	8	0.01%	0.009%	
Cauda Fortemente Dobrada	Controle	8	0.00%	0.00%	0,0031*
	Tratado	8	0.01125%	0.009%	

*P-valor com significância estatística

** Motilidade medida numa escala de 0-100.

*** Vigor medido em uma escala de 0-5.

Brito (2013) em sua pesquisa realizada com a administração 3 ml de óleo de Neem/kg de peso vivo (PV) por via oral a machos ovinos, constatou a redução na taxa de fertilidade à diminuição da motilidade da cauda dos espermatozoides, além de alterações morfológicas.

De acordo com Góes (2018) a adição de 20% e 40% de sementes de Neem na dieta de codorna durante 60 dias, foi capaz de interferir negativamente na qualidade do sêmen.

Em trabalho realizado por Góes (2018) com coelhos, foi observada a diminuição da produção de espermatozoide, acompanhada de aumento proporcional

de espermatozoides anormais, mostrando que a inclusão de folhas de Neem na dieta dos animais prejudicou a estrutura das células espermatogênicas.

ANÁLISE MORFOMÉTRICA

Dentre os parâmetros morfométricos testiculares, o diâmetro do túbulo seminífero e a altura de epitélio seminífero são mais frequentemente utilizados, por estarem diretamente relacionados com o potencial reprodutivo (MORAIS et al., 2012).

A análise morfométrica dos cortes de epitélio testicular na presente pesquisa evidenciou a mediana da altura epitelial no grupo controle de 86.77 μm sendo encontrado no grupo tratado, um valor inferior (69.02 μm). O teste de Mann- Witney constatou diferenças significativas entre os grupos. O mesmo acontece para o Diâmetro Tubular, onde o grupo tratado também apresentou medida da mediana inferior, confirmada pelo teste Mann-Witney com p valor = 0.003.

Comparando a mediana das Áreas externas – área Lúmen dos grupos controle e tratado, o teste de Mann Witney deixa claro as diferenças significativas conforme a Tabela 4. O teste R demonstra a diferença estatística entre os grupos controle e tratado, com relação à altura do epitélio germinativo (Figura 4).

Tabela 4 - análise morfométrica do epitélio testicular de ratos Wistar machos controle e tratados com extrato de Neem a 200mg/Kg.

Teste Mann- Witney	Média	Teste Mann Whitney	P-valor Mann Whitney
Altura do Epitélio controle	86.77 μm^{**}	64	0,000*
Altura do Epitélio tratado	69.02 μm		
Diâmetro Tubular controle	370.1 μm^{**}	63	0,003*
Diâmetro Tubular tratado	294.6 μm		
Área externa – área do Lúmen grupo controle	62.913 μm^{2**}	56	0,01*
Área externa – área do Lúmen grupo tratado	42.875 μm^2		

*P-valor com significância estatística

** Maior Média.

Em estudo realizado em codornas com a adição de 20% e 40% de sementes de Neem na dieta de codorna durante 60 dias, evidenciou a interferência negativa nos parâmetros biométricos testiculares, ocasionado por degeneração acentuada nas células germinativas, alteração nos parâmetros morfométricos testiculares e redução

da qualidade do sêmen (GÓES, 2018).

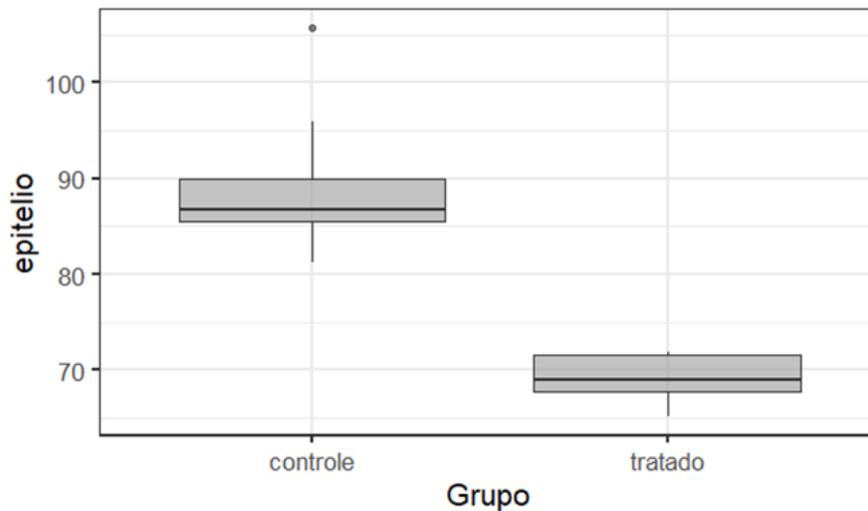


Figura 4: Box Plot dos grupos controle e tratado segundo a Altura do Epitélio germinativo de ratos Wistar machos controle e tratados com extrato de Neem a 200mg/Kg.

CARDOSO (2018) em sua pesquisa, verificou que extrato aquoso da folha de Neem administrado por oito dias via oral na concentração de 1000 ppm e 7.500 ppm apresentou baixa toxicidade, contudo apresentou resultados que levam a considerar sua capacidade contraceptiva por alterarem de forma negativa a motilidade e viabilidade espermática, corroborando nossa pesquisa.

ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Realizou-se a análise histopatológica de um dos testes de cada rato dos grupos controle e tratado. Observa-se os testículos dos ratos tratados se encontram com os contornos irregulares, caracterizados por uma túnica albugínea com variações na espessura do tecido conjuntivo denso, moderadas reentrâncias no parênquima testicular, além de descolamento capsular acompanhado por congestão e discreta hemorragia. Difusamente, o espaço peritubular estava preenchido por graus variados de edema e congestão. Eventualmente, esses achados foram acompanhados de discreta hemorragia e proliferação de tecido conjuntivo colagenoso.

No espaço tubular, observaram-se graus variados de degeneração e necrose epitelial, nos quais verificaram-se células germinativas e de Sertoli em cariólise, cariorrexia e células anucleadas. Por vezes, os túbulos seminíferos eram reduzidos apenas à membrana basal. Em sua maioria, os túbulos seminíferos exibiam

ERC3	-	-	-	-	-	-	-	-
ERC4	-	-	-	-	-	-	-	-
ERC5	-	-	-	-	-	-	-	-
ERC6	-	-	-	-	-	-	-	-
ERC7	-	-	-	-	-	-	-	-
ERC8	-	-	-	-	-	-	-	-
ERT9	+ a ++	-	+ a ++	+ a ++	+ a ++	-	+ a ++	+ a ++
ERT10	+ a ++	-	+ a ++	+ a ++	+ a ++	-	+ a ++	+ a ++
ERT11	+ a ++	-	+ a ++	+ a ++	+ a ++	-	+ a ++	+ a ++
ERT12	+ a ++	-	+ a ++	+ a ++	+ a ++	-	+ a ++	+ a ++
ERT13	+ a ++	-	+ a ++	++	+ a ++	-	+ a ++	+ a ++
ERT14	+ a ++	-	+ a ++	+ a ++	++ a +++	-	++	+ a ++
ERT15	+ a ++	-	+ a ++	+	++	-	+	+
ERT16	+ a ++	-	+ a ++	+ a ++	+ a ++	-	+	+

+: leve; ++: moderada; +++: severa; -: ausente

Existem alguns trabalhos na literatura que sugerem que o Neem pode apresentar toxicidade reprodutiva, por interferir negativamente na fertilidade de machos e/ou fêmeas (CARVALHO et al., 2015; BRASIL, 2013).

A degeneração do epitélio seminífero, é a causa mais comum do declínio reprodutivo, sendo um achado histológico típico de um processo de deterioração do parênquima testicular, podendo ser provocado por vários fatores, entre eles a administração de substâncias tóxicas presentes em plantas (SILVA, 2013).

Defalla (2012) também constatou alterações histopatológicas testiculares em animais alimentados com sementes de Neem, no qual foi registrado degeneração das células do epitélio germinativo de ratos tratado com 130 mg de extrato aquoso de sementes de Neem durante 14 dias.

Brito (2013), observou desorganização do epitélio seminífero, picnose nuclear e aglutinação de espermatozoides no epidídimo e no ducto deferente de ratos que receberam dose de 100 mg/kg de PV de extrato alcoólico da semente de Neem.

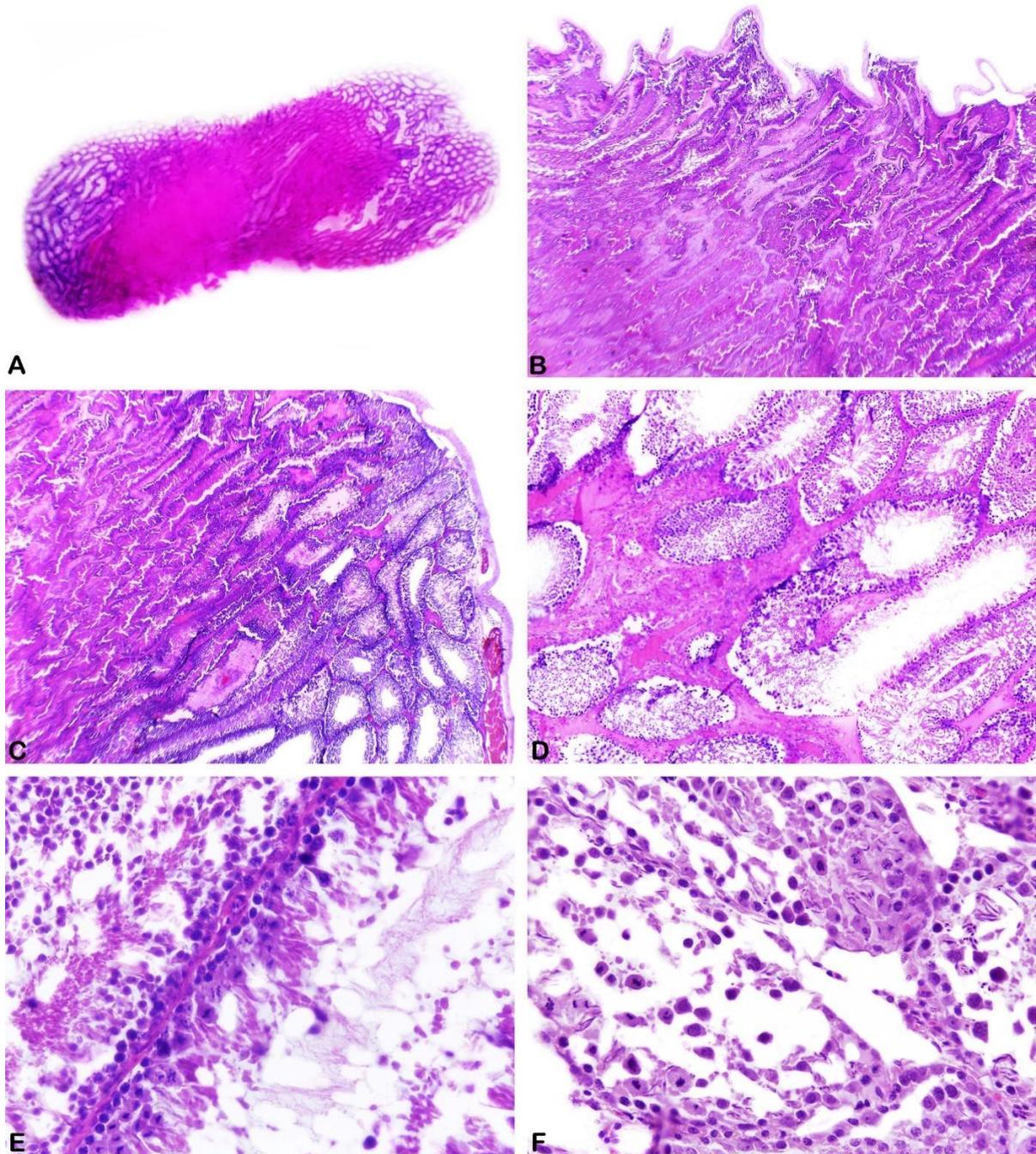


Figura 5. Fotomicrografias de testículo de rato Wistar machos tratados com extrato de Neem a 200mg/Kg. **A-** Testículo de rato Wistar intoxicado com extrato de Neem a 2000mg/kg (TR7). Notar área focalmente extensa intensamente eosinofílica de necrose de coagulação no parênquima testicular- 40x. **B-** Aumento da área anterior, evidenciando marcada irregularidade dos contornos testiculares, acompanhado pela túnica albugínea. Hematoxilina-eosina (HE) - 100x. **C-** Região de transição do parênquima testicular onde se nota túbulos com contornos irregulares e lúmen preenchido por material amorfo eosinofílico. HE - 200x. **D-** Notar área coalescente de leve deposição de tecido colagenoso no espaço peritubular associado a edema e congestão. HE - 200x. **E-** Maior aumento dos túbulos seminíferos íntegros. Notar perda de células germinativas e de Sertoli, com desprendimento para o lúmen em permeio aos flagelos de espermatozoides. HE - 400x. **F-** Maior aumento dos túbulos seminíferos degenerados. Notar desorganização do contingente celular intratubular. Há acentuadas características de necrose (picnose, cariólise e cariorrexia) e preservação da membrana basal. HE - 400x.

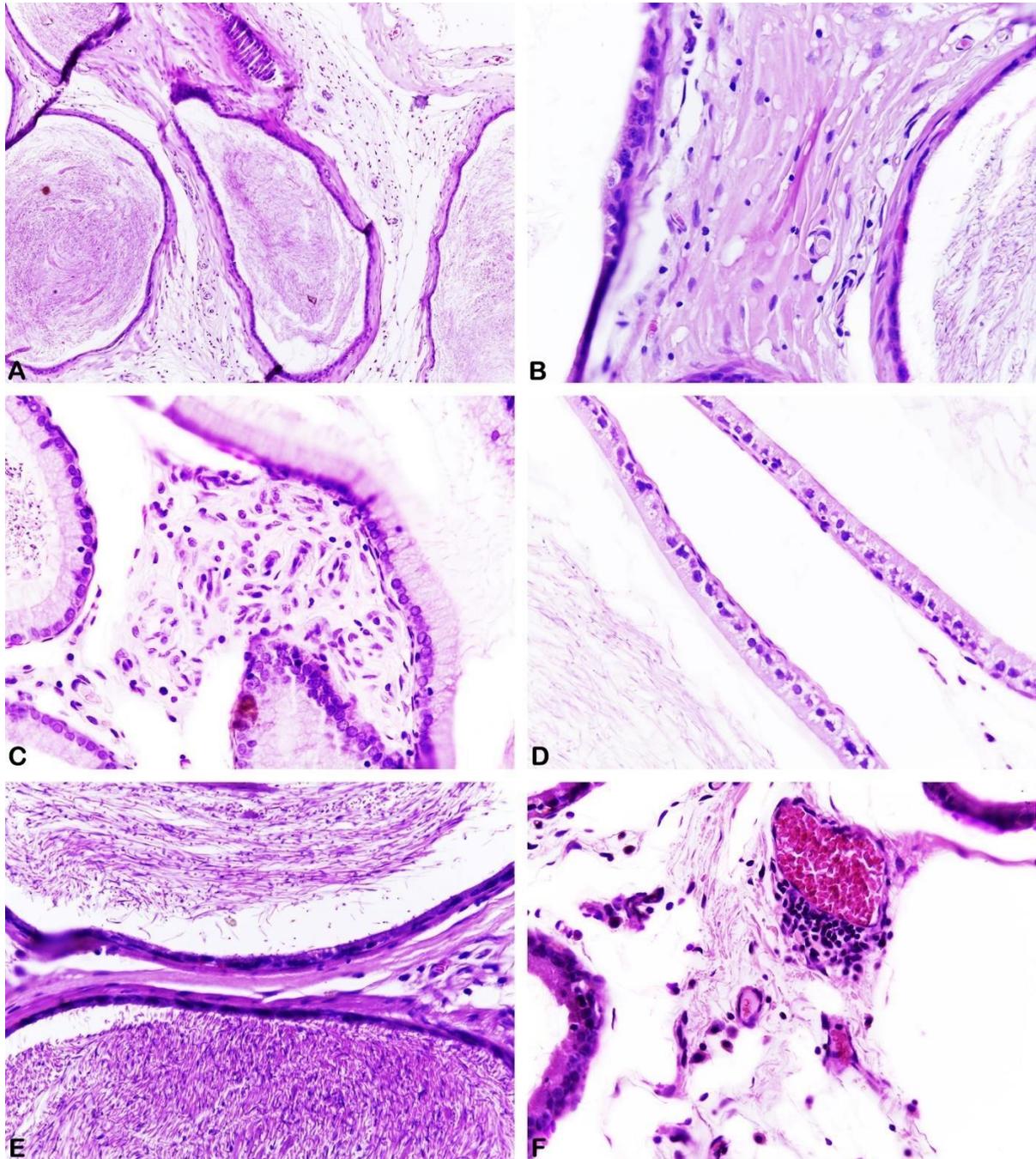


Figura 6. Fotomicrografia do epidídimo de ratos Wistar intoxicados com extrato de Neem a 2000mg/kg. **A-** Há edema e deposição de tecido conjuntivo colagenoso intersticial difusamente nas secções. Hematoxilina-eosina (HE - 100x). **B-** Maior aumento das recentes áreas de fibrose onde se nota fibras eosinofílicas intumescidas espessas em permeio a edema. HE - 400x. **C-** Área de fibrose e neovascularização intersticial. HE - 400X. **D-** Notar epitélio cilíndrico simples e intensamente vacuolizado com esparsos estereocílios contornando os dutos epididimários. HE - 400x. **E.** Esse mesmo epitélio por vezes era rebaixado assemelhando-se a um epitélio pavimentoso. HE - 400x. **F-** Infiltrado inflamatório perivascular composto majoritariamente por linfócitos acompanhando edema intersticial. HE - 400x.

CONCLUSÃO

Com base nas análises, conclui-se que o tratamento com o extrato aquoso da semente de *Azadirachta indica*, por via oral na dose de 2000mg/kg ocasionou alterações no sistema reprodutor masculino de ratos, constatando assim, a toxicidade reprodutiva do extrato de Neem, podendo o mesmo ser utilizado no estudo e desenvolvimento de medicações contraceptivas.

REFERÊNCIAS

- AZEVEDO, G.T.O.S.; NOVAES, A.B.; AZEVEDO, G.B.; SILVA, H.F. Desenvolvimento de Mudanças de Nim Indiano sob Diferentes Níveis de Sombreamento. **Floresta e Ambiente**, v. 22, p. 249-255, 2015.
- BRAGA, Teresa M. et al. *Azadirachta indica* A. Juss. *In Vivo Toxicity—An Updated Review*. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 252, 2021.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. Fitoterápicos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos> Acesso em: 28/04/2022.
- BRASIL, R.B. Aspectos botânicos, usos tradicionais e potencialidades de *Azadirachta indica* (Neem). **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia**, v.9, n.17, 2013.
- BRITO, Osvaldo Santos. **Efeitos do óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre a reprodução e perfil metabólico de machos ovinos**. 2013. 74f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2013.
- AUTA, T.; HASSAN, A.T. Reproductive toxicity of aqueous wood-ash extract of *Azadirachta indica* (neem) on male albino mice. **Asian Pacific Journal of Reproduction**. v. 5, n.2, p. 111 – 115. 2015.
- CABRAL, V. X.; FREITAS, S. P. Fitoterapia na Medicina Veterinária—uso de Sálvia e Tomilho: Revisão Bibliográfica. **Anais congrega mic-ISBN 978-65-86471-05-2**, v. 16, p. 557-561, 2020.
- CARDOSO, Celi Aparecida. **Avaliação de danos induzidos em ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* expostos ao extrato aquoso de neem (*Azadirachta indica*) em mesmas concentrações utilizadas na lavoura de milho (*Zea mays*) para o controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*)**. Tese (Doutorado em Biociência Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2018.
- CARVALHO, S.S.; VANDRAMIM, J.D.; SÁ, I.C.G.; SILVA, M.F.G.F.; RIBEIRO, L.P.; FORIM, M.R. Efeito inseticida sistêmico de nanoformulações à base de nim sobre *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biótipo B em tomateiro. **Fitossanidade/Artigo**. *Bragantia*, Campinas, v. 74, n. 3, p.298-306, 2015.
- COSTA, E. M. et al. Extrato aquoso de sementes de nim no controle de *Liriomyza sativae* (Diptera: Agromyzidae) em meloeiro. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, p. 401-406, 2016.
- DAFALLA, M.B.; KONOZY, E.H.; SAAD, H.A. Biochemical and histological studies on the effects of *Azadirachta indica* seeds kernel extract on albino rats.

International Journal of Medicinal Plant Research. Vol. 1(6), pp. 082-092, 2012.

DA SILVA, É. S. et al. Controle alternativo de insetos de importância agrícola com uso de extratos vegetais de *Azadirachta indica* (Nim), em Feira de Santana, Bahia, Brasil. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 6579-6586, 2021.

DE CASTRO COITINHO et al. Predação de ninfas *Diaspis echinocacti* (Bouché)(Hemiptera: Diaspididae) por larvas de *Leucochrysa* (Nodita) sp.(Neuroptera: Chrysopidae). **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 23, n. 1, p. 5, 2018.

GARCIA, A.R. Degeneração testicular: um problema superado ou ainda um dilema?. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v.41, n.1, p.33-39, Belo Horizonte, 2017.

GÓIS, Rayr Cezar de Souza. **Toxicidade reprodutiva da semente de neem (*azadirachta indica* A. Juss.) Em codorna (*coturnix coturnix japônica linnaeus, 1758*) macho: Características seminais, estudo histopatológico e Histomorfométrico do parênquima testicular**. Dissertação (Mestrado em Ciência animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Rio Grande do Norte, 2018. Disponível em:

<https://repositorio.ufersa.edu.br/handle/prefix/975>

GONÇALVES, M. E. C.; BLEICHER, E. Uso de extratos aquosos de nim e azadiractina via sistema radicular para o controle de mosca - branca em meloeiro. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 37, n. 2, p. 182-187, 2006.

HARLAND-LANG, L. A.; KHOZE, V. A.; RYSKIN, M. G. Exclusive physics at the LHC with SuperChic 2. **The European Physical Journal C**, v. 76, n. 1, p. 1-20, 2016.

KATTE, T., RAJYALAKSHMI, M.; ALADAKATTI, R. Assessment of azadirachtin-A, a neem tetranortritarpinoid, on rat spermatozoa during in vitro capacitation. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**. v.0, n.0, p. 1 -9. 2018.

KANTER, Jonathan W. et al. What is behavioral activation?: A review of the empirical literature. **Clinical psychology review**, v. 30, n. 6, p. 608-620, 2010.

KUMAR, V.S.; NAVARATNAM, V. Neem (*Azadirachta indica*): prehistory to contemporary medicinal uses to humankind. **Asian Pac J Trop Biomed**. 2013 Jul;3(7):505-14. doi: 10.1016/S2221-1691(13)60105-7. PMID: 23835719; PMCID: PMC3695574.

LEMONICA, I.P. Toxicologia da reprodução. In: OGA, S.; ALMEIDA CAMARGO, M.M.; OLIVEIRA BASTITUZZO, J.A. (Ed.). **Fundamentos de toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2008. Cap. 1.8, p. 104-113.

LIMA, C. D. et al. Prospecção Científica e Tecnológica de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott com Enfoque na Atividade Anti-helmíntica. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e9111527841-e9111527841, 2022.

LISANTI, E. et al. The DNA and Spermatozoa Quality of Mice (*Mus musculus albinus*) after Administration Aqueous Leaves and Seeds Extract of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). **Journal of Pharmacy**. v.06, n.10, p.01-09, 2016.

LISANTI, E. et al. The effect of aqueous seed extract of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) on liver histology of male mice (*Mus musculus albinus*). **AIP Conference Proceedings**. v. 2019. n. 1. p. 1-6, 2018.

OJEWALE, A.O. et al. Testiculo Protective Effects of Ethanolic Roots Extract of *Pseudocedrela kotschyi* on Alloxan Induced Testicular Damage in Diabetic Rats. **British Journal of Medicine & Medical Research**. v.4, n.1, p. 548-563, 2014

PAUL, R; PRASAD, M; SAH, N.K. Anticancer biology of *Azadirachta indica* L (neem): a mini review. **Cancer Biol Ther**. 2011 Sep 15;12(6):467-76. doi: 10.4161/cbt.12.6.16850. Epub 2011 Sep 15. PMID: 21743298.

SADLER, T.W. Langman: embriologia médica. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

SHAIKH, M. A.; NAQVI, S. N. H.; CHAUDHRY, M. Z. Effect of neem oil on the structure and function of the mature male albino rat testes. **Journal of Morphological Sciences**, v. 26, n. 1, p. 0-0, 2017.

SALEEM, S.; Muhammad, G.; Hussain, MA; Bukhari, SNA Uma revisão abrangente do perfil fitoquímico, bioativos para produtos farmacêuticos e atributos farmacológicos de *Azadirachta indica*. **Phyther. Res**. 2018, 32, 1241-1272.

SATHIYARAJ, K. et al. Spermicidal activity of *Azadirachta indica* (Neem) aqueous leaf extract on male Albino rats. **International Journal of PharmTech Research**. v.2 n.1 p.588-591, 2010.

SAXENA, R. C.; JILANI, G.; KAREEM, A. Abdul. Effects of neem on stored grain insects. In: **1988 Focus on Phytochemical Pesticides**. CRC Press, 2018. p. 97-112.

SHARMA, S; K; SHARMA, M. Examinando o papel das dimensões de confiança e qualidade no uso real de serviços bancários móveis: uma investigação empírica. **Revista Internacional de Gestão da Informação**. 2019.

SHAIKH, M. A.; NAQVI, S. N; KHANI, Z.A.K. Efeitos do óleo de Nim (Neem) na estrutura e função de ovários de ratas albinas adultas. **Einstein**. (São Paulo), p. 28-34, 2009.

SILVA, V.C.L. **Avaliação da Toxicidade Reprodutiva de Ratas Wistar Submetidas à Ingestão do Extrato Etanólico das Folhas de Nim (*Azadirachta indica* A. Jus)**. 2010. Tese de Doutorado. Rural Federal University of Pernambuco.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.

WEIL, T. **American Chemical Society**. 2021. Disponível em: <https://www.acs.org/content/acs/en/about.html>. Acesso em: 8 set. 2022.

ANEXO I- REGISTRO DA PARTE EXPERIMENTAL

DIVISÃO DOS GRUPOS



GAVAGEM



SEDAÇÃO E COLETA DO SÊMEN



AVALIAÇÃO DA MOTILIDADE



COLORAÇÃO DAS LÂMINAS

