



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL - PPGCA
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

RAYR CEZAR DE SOUZA GÓIS

**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**

MOSSORÓ-RN

2018

RAYR CEZAR DE SOUZA GÓIS

**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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Orientador: Prof. Dr. Jael Soares Batista

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Iberê
Alves Freitas

MOSSORÓ-RN

2018

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

G616t Gois, 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 / Rayr
Cezar de Souza Gois. - 2018.
48 f. : il.

Orientador: Jael Soares Batista.
Coorientador: Carlos Iberê Alves Freitas.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2018.

1. Alterações testiculares . 2. Qualidade
espermática . 3. Aves . 4. Intoxicação . 5. Neem.
I. Batista, Jael Soares , orient. II. Freitas,
Carlos Iberê Alves , co-orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

RAYR CEZAR DE SOUZA GÓIS

**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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Sanidade Animal

Defendida em: 17 /12 /2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Jael Soares Batista (UFERSA)
Presidente

Prof^o. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas (UFERSA)
Membro Examinador Interno

Prof^o. Dr. Wirton Peixoto Costa (UFERSA)
Membro Examinador Externo

Prof^o. Dr. Jean Berg Alves da Silva (UFERSA)
Membro Examinador Interno suplente

Prof.^a Dr.^a. Juliana Fortes Vilarinho Braga (UFERSA)
Membro Examinador Externo Suplente

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar 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 a toda minha família, principalmente a meus pais Rildo Souza de Gois e Josielma de Souza Cruz e Gois, que apesar de todas as dificuldades enfrentadas, sempre acreditaram na educação, mostrando-me o caminho da honestidade, simplicidade e humildade.

Agradeço a meus avós maternos José de Souza Filho e Maria Ferreira de Souza e avós paternos Raimundo Jeremias de Góis e Neuza Souza de Góis, por me darem apoio moral e motivacional.

Agradeço ao meu tio José Dionízio de Souza pelas inúmeras caronas que me deu no trajeto entre minha casa e a universidade. A minha tia Joelma Marcia pelo apoio incondicional, me colocando em um patamar que um dia almejo alcançar. A meu tio José Júnior pelo apoio na confecção de alguns objetos de trabalho. A minha tia Rilza Souza e meu tio Raildo Souza por servirem de exemplos, mostrando que o estudo recompensa. A meu irmão Pedro Igor de Souza Gois no auxílio em trabalhos cotidianos na lida com os animais.

Agradeço a minha Namorada e amiga Helena Maria de Moraes Neta por me apoiar tanto nos bons, como nos maus momentos de minha vida dentro e fora da Universidade, sempre me aconselhando para o bem e me incentivando a nunca desistir. A sua família que me acolheu carinhosamente, no qual tenho enorme admiração e respeito.

Agradeço aos professores e em especial ao meu orientador Jael Soares Batista pela orientação, conhecimentos e experiências compartilhadas durante toda minha graduação e agora na pós-graduação.

Agradeço aos meus muitos amigos em especial: Leandro Alves, Hélio Junior, Hélia Silva, Nilson Liberato e Hélio de Souza.

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 Obrigado.

**Nossa maior fraqueza está em desistir. O
caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.**
Thomas Edison

RESUMO

O neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) é uma planta que foi introduzida no Brasil com o objetivo de ser utilizada no desenvolvimento de um inseticida natural. Essa planta possui várias atividades já descritas em literatura: inseticida, bactericida, fungicida, anti-inflamatório, hepatoprotetor, anti diabético, vermífugo, carrapaticida e espermicida, além de provocar efeitos negativos na reprodução de insetos e mamíferos, porém, essa ação negativa em aves, ainda não foi descrita em literatura. O presente estudo objetiva avaliar a toxicidade reprodutiva da semente neem em aves utilizando a codorna como modelo experimental. Para isso, 50 codornas (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) machos adultos foram distribuídas em cinco grupos experimentais, sendo: T1, T2, T3, T4 e T5, que receberam dieta contendo respectivamente, 0%, 5%, 10%, 20% e 40% de semente incorporada à ração, durante 60 dias. Após o período experimental, foi coletado sêmen do ducto deferente de cada ave para análises espermáticas (concentração, motilidade, vigor, viabilidade e morfologia). Para determinar os parâmetros biométricos, os testículos foram pesados em balança analítica e mensurados com o auxílio de um paquímetro digital. A seguir, os testículos foram fixados em solução de bouin e submetidos a confecção de lâminas histológicas coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE), sendo avaliadas por microscopia óptica para estudo das alterações histopatológicas do parênquima testicular. Os cortes histológicos também foram avaliados quanto aos parâmetros morfométricos testiculares: espessura da túnica albugínea, diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio germinativo. As análises estatísticas foram feitas pelo software SAS (1999) e teste-t de Student com 5% ($P < 0,05$) de significância. Os valores morfométricos reduziram significativamente nos T4 e T5 pois as aves dos referidos grupos apresentaram degeneração acentuada das células do epitélio germinativo. As mensurações histomorfométricas dos testículos mostraram que os animais do T4 e T5 apresentaram aumento significativo ($P < 0,01$) dos valores médios da espessura da túnica albugínea e redução significativa dos valores do diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio germinativo nos T4 e T5. Nos referidos tratamentos, houve redução significativa dos valores da análise espermática. A adição de 20% e 40% de sementes de neem na dieta de codorna durante 60 dias, foi capaz de interferir negativamente nos parâmetros biométricos testiculares, causando um quadro degenerativo acentuado nas células germinativas, alterando os parâmetros morfométricos testiculares e reduzindo a qualidade do sêmen.

Palavras-chave: 1. Alterações testiculares 2. Qualidade espermática 3. Aves 4. Intoxicação experimental 5. Neem

ABSTRACT

The Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) is a plant that was introduced in Brazil with the aim to be utilized in the development of natural insecticide, that could be used in the crops. This plant has several activities already described in the literature: bactericide, fungicide, anti-inflammatory, hepatoprotective, anti-diabetic, vermifuge, acaricidal and spermicide, besides causing negative effects on the reproduction of insects and mammals. However, this negative action in birds, hasn't been described in the literature. Thus, the present work aims to evaluate reproductive toxicity of neem seed in birds using the quail as an experimental model. Therefore, 50 quails (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) adult males will be distributed in five experimental groups: T1, T2, T3, T4 and T5. They will receive diet containing: 0, 5, 10, 20 and 40% of seed incorporated into the feed during 60 days. After the experimental period, the semen will be collected from the deferent duct of each bird for sperm analysis (concentration, motility, vigor, viability, and morphology). To determine the biometric parameters, the testicles will be weighed on an analytical scale and measured with the aid of a digital caliper, obtaining values referring to the weight, length and width of the right and left testicle. Afterwards, the testicles will be fixed in Bouin solution and submitted to the preparation of histological laminae, stained by Hematoxylin and Eosin (HE). The laminae will be evaluated by optical microscopy to study the histopathological alterations of the testicular parenchyma. The histological changes also will be evaluated by testicular morphometric parameters: tunica albuginea thickness, seminiferous tubule diameter, and the germinal epithelial height. Statistical analysis will be performed by SAS software (1999) and Student's t-test with 5% ($P < 0,05$) of significance. The histological analysis revealed that the birds belonging to these groups presented degeneration of germinal epithelial cells. The histomorphometric measurements of the testicles showed that the T4 and T5 animals presented a significant increase ($P < 0,01$) in the average value of the tunica albuginea thickness, and a significant reduction in the values of the seminiferous tubule diameter, and the height of the germinal epithelium in T4 and T5. In the treatments mentioned there was significantly reduced of: average values of seminal volume, sperm concentration, sperm motility, vigor and spermatid viability.

Keywords: 1. Testicular alterations, 2. Spermatic quality, 3. Birds, 4. Experimental intoxication, 5. Neem.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspecto macroscópico dos testículos de codornas (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) submetidas à dieta contendo 40% (T5) de sementes de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) evidenciando notável atrofia testicular.....50

Figura 2 - Aspecto macroscópico dos testículos de codornas (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) com dieta isenta de sementes de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) - T1, evidenciando aspecto e tamanho normais.....50

Figura 3 - Aspecto histológico do testículo de codorna (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) submetidas à dieta contendo 40% de sementes neem (*Azadirachta indica* A. Juss), T5, evidenciando túbulos seminíferos de pequenas dimensões, contendo apenas uma camada de células germinativa e ausência de espermatozóides no lúmen tubular. Hematoxilina-Eosina, Obj. 40x.....51

Figura 4 - Aspecto histológico do testículo de codorna (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) que recebeu dieta isenta de sementes de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) – T1, evidenciando túbulos seminíferos de tamanho normal, epitélio germinativo inalterado, em diferentes estágios de maturação, com presença de espermatozóides no lúmen tubular. Hematoxilina-Eosina, Obj. 40x.....51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios e respectivos desvios-padrão dos parâmetros biométricos do testículo direito (TD) e testículo esquerdo (TE), e Índice gonadosomático de codornas (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758), submetidas à dieta contendo diferentes percentuais de sementes de neem (*Azadirachta indica* A. Juss).....48

Tabela 2 - Valores médios e respectivos desvios-padrão da espessura da túnica albugínea (ETA), diâmetro do túbulo seminífero (DTS) e altura do epitélio germinativo (AEG) dos testículo direito (TD) e testículo esquerdo (TE) de codornas (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) mensuradas em micrômetros (μm), submetidas à dieta contendo diferentes percentuais de sementes neem (*Azadirachta indica* A Juss).....48

Tabela 3 - Média e respectivos desvios-padrão dos parâmetros seminais de codornas (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758), submetidas à dieta contendo diferentes percentuais de semente neem (*Azadirachta indica* A. Juss).....49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Dr: Doutor

Dr^a: Doutora

Prof: Professor

Prof^a: Professora

PPGCA: Progra de Pós-graduação em Ciência Animal

RN: Rio Grande do Norte

Nº: Número

CIP: Catalogação Internacional da Publicação

BCOT: Biblioteca Central Orlando Teixeira

SIR: Setor de Informação e Referência

UFERSA: Universidade Federal Rural do Semi-Árido

HE: Hematoxilina e Eosina

SAS: Statistical Analysis System

T1: Tratamento 1

T2: Tratamento 2

T3: Tratamento 3

T4: Tratamento 4

T5: Tratamento 5

TE: Testículo Esquerdo

TD: Testículo Direito

DTS: Diâmetro dos Túbulos Seminíferos

ETA: Espessura da Túnica Albugínea

AEG: Altura do Epitélio Germinativo

UI: Unidade Internacional

Cº: Graus Celsius

mL: Mililitro

uL: Microlitro

cm: Centímetro

mm: Milímetro

m: Metro

Kg: Quilograma

Kcal: Quilocaloria

EM: Energia Metabolizada

PB: Proteína Bruta

Ca: Cálcio

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

LH: Hormônio Luteinizante

ATPase: Enzima

CEUA: Comissão de Experimentação e Uso de Animais

ANOVA: Análises de Variância

Obj: Objetiva

PV: Peso Vivo

LISTA DE SÍMBOLOS

@	Arroba
©	Copyright
®	Marca registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2- REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Neem (Azadirachta indica A. Juss.)	20
2.2 Diferentes utilidades do neem.....	22
2.3 Toxicidade reprodutiva do neem.....	23
2.4 Aspectos biométricos, morfológicos e degenerativos testiculares.....	26
3- CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
4 REFERÊNCIAS	29
CAPITULO 1	35
APÊNDICES	48

1 INTRODUÇÃO

O neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) é uma espécie arbórea da família Meliaceae, nativa da Índia, que vem sendo utilizada há séculos para os mais variados fins, sendo atualmente cultivado em vários países da África, Austrália e América latina (SOARES FILHO *et al.*, 2015). Para Mossini & Kemmelmeier (2005), essa planta tem sido utilizada por séculos no Oriente como planta medicinal (no tratamento de inflamações, infecções virais, hipertensão e febre), sombreadora, repelente, material para construção, combustível, lubrificante, adubo e mais recentemente como praguicida e os autores ainda acrescentam que devido à baixa toxicidade e larga distribuição na natureza, o neem pode ser considerado como uma valiosa fonte para uso na Medicina tradicional e no desenvolvimento de drogas modernas (MOSSINI & KEMMELMEIER, 2005).

A planta foi introduzida no Brasil em 1986 por meio do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR com o objetivo de se desenvolver um inseticida natural (BRASIL, 2013). Por ser resistente à seca, tolerante à maioria dos solos, incluindo os poucos profundos, secos, pedregosos e areias altamente lixiviadas por apresentar crescimento rápido, produzir grande quantidade de folhas sempre verdes e proporcionar boa qualidade de sombra, o neem foi disseminado rapidamente no semiárido do Nordeste brasileiro, sendo atualmente muito usado na arborização de ruas, praças, parques e jardins (AZEVEDO *et al.*, 2015).

O neem desperta interesse devido à sua grande versatilidade quanto ao seu uso; o óleo de neem é utilizado na fabricação de xampu, loções hidratantes, sabonete, condicionadores e óleo para cabelo e tônico capilar (BRASIL, 2010). A árvore produz madeira de excelente qualidade, que vem sendo explorada para o reflorestamento, paisagismo e combate a desertificação (PAES *et al.* 2011). Além de apresentar potencial de uso como suplemento alimentar animal, podendo até mesmo substituir a ração em alguns casos (ASSUNÇÃO, 2016).

Na semente, folha, flor, casca e raiz do neem estão presentes grande número de compostos bioativos, que garantem grande versatilidade quanto ao seu uso (OGBUEWU *et al.*, 2009a). A maioria dos componentes caracterizados da semente do neem são limonóides, essa substância pertence a classe dos terpenos e são conhecidos como meliacinas por apresentarem gosto amargo. Dentre os limonoides presentes nas sementes, a azadiractina tem

maior importância por ser responsável pela maioria dos efeitos biológicos (AZEVEDO *et al.*, 2015).

A azadiractina possui efeitos antialimentar, tóxico, repelente e contraceptivo para insetos, sendo considerado, um bioinseticida de excelente qualidade, tão potente quanto os inseticidas comerciais, além de ser biodegradável, evitando-se assim contaminação do ambiente (BRASIL, 2013). A planta tem mostrado acentuada atividade inseticida para várias espécies de pragas, incluindo a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), considerada a mais importante praga do milho no Brasil. Para Viana (2006), é possível perceber que pequenas quantidades de azadiractina reduz a alimentação, retarda a ecdise, causa a mortalidade de larvas, pupas e esteriliza os adultos de várias espécies de lepidópteros.

Em relação ao uso medicinal, uma série de propriedades da azadiractina e outros ingredientes ativos do neem são descritas na literatura, tais como antimicrobiano (PAES *et al.*, 2015), anti-inflamatório (ASSUNÇÃO, 2016), hepatoprotetor (BRASIL, 2013), antitumoral (SCHUMACHER *et al.*, 2011), antimalárico (ALZOHAIRY, 2016), antidiabético (ROSA *et al.*, 2010) carrapaticida (MICHELETTI *et al.*, 2010), antiviral (SOARES FILHO *et al.*, 2015) e vermífugo (LIPINSKI *et al.*, 2011).

Além disso, alguns estudos apontam que o neem tem efeito negativo na função reprodutiva de humanos e animais por promover o declínio dos parâmetros seminais (volume e concentração do ejaculado, motilidade e alterações morfológicas dos espermatozoides), comprovada ação espermicida e efeito contraceptivo vaginal (BRASIL, 2013; CLAVIJO *et al.*, 2012; SILVA, 2010). Além de interferir no ciclo estral das fêmeas, no desenvolvimento embrionário precoce e promover aborto (SILVA, 2010).

Algumas espécies exóticas quando introduzidas em uma região diferente da sua distribuição, apresentam alta capacidade de crescimento, proliferação e dispersão, sendo capazes de modificar a composição, estrutura ou função do ecossistema, além de provocar efeito tóxico e perdas produtivas (BONALDI; HASSE, 2016).

Toxicidade reprodutiva é a capacidade de uma substância interagir negativamente na reprodução de um indivíduo macho e/ou fêmea. Algumas plantas são já são reconhecidas como tóxicas para a reprodução tanto de machos como de fêmeas. Nos machos, o gossipol presente no caroço do algodão (*Gossypium hirsutum* L.), e nas fêmeas a jurema preta (*Mimosa*

tenuiflora) e o pereiro (*Aspidosperma pyrifolium*) são exemplos de plantas que afetam negativamente a reprodução de animais (RIET- CORREA; BEZERRA; MEDEIROS, 2011).

Pouco se sabe sobre a toxicidade reprodutiva do neem indiano em aves domésticas e silvestres. Segundo Brito (2013), embora o neem seja reconhecido por suas diferentes propriedades e formas de uso, o potencial anticonceptivo não pode ser ignorado. Oliveira (2009), alerta para a possibilidade do neem causar esterilidade em algumas espécies de pássaros que se alimentam das suas sementes, uma vez que, no semiárido do nordeste essa árvore produz expressivas quantidades de sementes na época da estação seca, quando há pouca disponibilidade de alimentos.

Considerando que o neem provoca efeitos deletérios na fertilidade de mamíferos e insetos, fato comprovado em várias pesquisas, sabendo que há a possibilidade do consumo de sementes do neem promover efeito negativo na reprodução de aves, objetivou-se com isso aprofundar o conhecimento sobre a toxicidade reprodutiva do neem por meio da avaliação do efeito da alimentação com sementes de neem sobre as características seminais, biométricas e morfométricas testicular utilizando codorna (*Coturnix coturnix japonica* A. Juss) como modelo experimental.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.)

A planta conhecida como neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), pertencente à família Meliaceae, é uma árvore de porte médio que varia de 15 a 20 metros de altura e diâmetro da copa que varia de 8 a 12 metros, possui uma boa copa proporcionando bastante área de sombra (BRASIL, 2013), por isso mesmo, é bastante cultivada para uso ornamental, na proteção de ambientes contra exposição solar intensa.

São árvores atrativas, com grande quantidade de folhas sempre verdes, do tipo imparipenadas, alternadas, com folíolos de coloração verde-claro intenso, que caem somente em casos de seca extrema. As raízes penetram profundamente no solo, onde o local permite, e quando sofrem algum tipo de dano, produzem brotos. O sistema radicular da planta é composto por uma raiz pivotante, sua principal sustentação, possibilitando a retirada de água e nutrientes de grandes profundidades e de raízes laterais auxiliares (MOSSINI & KEMMELMEIER, 2005). É de fácil propagação, tanto sexual, quanto vegetativa e pode ser plantada usando-se sementes, mudas, rebentos ou cultura de tecidos. Ainda, pode-se obter árvores de neem também por estaquia, porém, o desenvolvimento das raízes não se dá de modo adequado, tornando a árvore suscetível à queda por ventos fortes. Possui flores hermafroditas, com fecundação cruzada, desta forma são necessárias pelo menos duas plantas crescendo próximas para ocorrer troca de pólen e produção de frutos (VIANA *et al.*, 2006).

Ainda se reportando às suas características e se respaldando em Mossini & Kimmelmeier (2005), as flores são pequenas, brancas, bissexuadas, brotam em feixes axiais, arranjando-se em inflorescências de cerca de 25 cm de comprimento; possuem um perfume semelhante ao mel e atraem muitas abelhas. Os frutos são lisos, glabos, elipsóides, com 1,5 cm x 2 cm de comprimento, de cor amarelada quando maduros, com uma polpa doce envolvendo as sementes, que são compostas por uma casca e um ou mais caroços. As sementes e as folhas são usualmente empregadas no controle de pragas.

É capaz de suportar condições extremas de calor e pouca água, além de melhorar a fertilidade do solo e reabilitar pastagens degradadas. Além disto, a planta exerce um papel importante no controle da erosão do solo, na salinização e prevenção contra os efeitos de inundações (SOARES *et al.*, 2012). A madeira é de boa qualidade, serve para a construção

civil, fabricação de móveis, estacas e mourões, os galhos tortuosos, podem ser aproveitados para a produção de carvão vegetal (BRASIL, 2013).

Na semente, folha, flor, casca e raízes do neem, estão presentes grande número de compostos bioativos, que garantem grande versatilidade quanto ao seu uso, entre estes, destacam-se a salanina, azadiractina, meliantrol, azadirona, gedunina, nimbolina (OGBUEWU *et al.*, 2009). Segundo BEVILACQUA *et al* (2008), o neem apresenta efeito em mais de 200 espécies de organismos, incluindo ácaros, carrapatos, aranhas, nematóides, fungos, bactérias e mesmo alguns fitovírus, provavelmente, em decorrência dessas inúmeras substâncias que a planta apresenta. A azadiractina encontrada principalmente nas sementes, é considerada a substância de maior importância pois é responsável pela maioria dos efeitos biológicos (CARVALHO *et al.*, 2015). A azadiractina possui efeitos antialimentar, tóxico, repelente e contraceptiva para insetos, sendo considerado, um bioinseticida de excelente qualidade, tão potente quanto os inseticidas comerciais, além de ser biodegradável, evitando-se assim contaminação do ambiente (BRITO, 2013).

Por ser uma planta que apresenta essa diversidade de compostos bioativos é que tem sido estudada para vários fins. Segundo Mossini & Kemmelmeier (2005), apesar dos compostos bioativos serem encontrados em toda a planta, as sementes e folhas são as partes que possuem maiores concentrações dos componentes e são mais acessíveis e facilmente obtidos por processos de extração tanto em água como solventes. Para Martinez (2002) essas substâncias apresentam também efeitos múltiplos sobre artrópodes como em inibição da alimentação, repelência, diminuição da oviposição, interrupção do desenvolvimento da ecdise e redução da fertilidade, fecundidade e mortalidade.

Em relação ao uso medicinal, uma série de propriedades da azadiractina e outros ingredientes ativos do neem são descritas na literatura, tais como carrapaticida (MICHELETTI *et al.*, 2010), vermífugo (LIPINSKI *et al.*, 2011), antimalárico (ALZOHAIY, 2016), hepatoprotetor (BRASIL, 2013), anti-inflamatório (ASSUNÇÃO, 2016), antimicrobiano (PAES *et al.*, 2015), antitumoral (SCHUMACHER, 2011), antidiabético (ROSA *et al.* 2010) e antiviral (SOARES FILHO *et al.*, 2015).

No que concerne aos aspectos ambientais, Macedo (2007) ainda afirma que a utilização do neem é importante para o controle de doenças, pois os produtos são biodegradáveis, não havendo contaminações do solo nem causando efeitos deletérios ao ambiente. Outra vantagem

na utilização desta planta é que são fontes autossustentáveis, principalmente quando são utilizadas suas folhas e frutos, não havendo a necessidade do corte das árvores.

Conforme apregoam Carpanezzi & Neves (2010), os frutos constituem o produto mais nobre do neem, em virtude do seu valor econômico, às múltiplas aplicações e à ausência de sucedâneos. Entretanto, ainda segundo os autores, não existem índices confiáveis sobre produtividade de frutos de neem no Brasil e mesmo no mundo, seja por árvore ou por hectare. A produtividade varia com fatores genéticos e ambientais; os valores numéricos relatados são muito diferentes entre si, referem-se comumente a árvores em situações imprecisas (sem definição de espaçamento ou idade ou do número de anos observado, por exemplo) e são expressos em unidades variadas e inadequadas, como frutos ou sementes sem menção precisa ao grau de umidade.

2.2 Diferentes utilidades do neem

Com a diversidade de propriedades existentes no neem, atualmente o seu uso tem se propagado, uma vez que apresenta ação contra um amplo grupo de organismos, além de ser biodegradável.

Na agricultura, apesar de os efeitos de produtos à base de neem serem bastante conhecidos no controle de insetos, podem também influenciar outros organismos como os nematóides (uma das pragas mais devastadoras na agricultura), caramujos (especialmente *Biomphalaria glabrata*, auxiliando no controle da esquistossomose), crustáceos (que prejudicam culturas de arroz por utilizarem as mesmas fontes de nitrogênio), viroses de plantas e fungos (MOSSINI & KEMMELMEIER, 2005). Produtos à base de neem têm sido aplicados em culturas por meio de polvilhamento do pó de sementes e folhas, para controle de pragas como a lagarta e mediante pulverização de extratos aquosos ou de soluções de óleo emulsionável para controle de insetos e outras pragas foliares (MARTINEZ, 2002).

De acordo com Quintela & Pinheiro (2004), os inseticidas à base de neem apresentam baixo custo e podem ser produzidos de forma bastante simples. Em relação aos agrotóxicos, são considerados menos poluentes, com baixo poder residual e apresentam menor risco de intoxicação para mamíferos e aves.

No campo pecuário e veterinário, o neem também vem ganhando destaque, pois além da ação repelente contra carrapato e mosca-do-chifre, vem sendo utilizado no controle de

pulgas e piolhos, na cicatrização e assepsia de ferimentos, na cura da sarna e como vermífugo (MARTINEZ, 2002). Segundo Anandan *et al* (1996) apud Mossini & Kemmelmeier (2005), o uso da torta de neem como suplemento alimentar vem sendo avaliado com resultados satisfatórios tanto do ponto de vista econômico, quanto da segurança, podendo até mesmo substituir a ração em alguns casos.

Em virtude também de suas propriedades medicinais, o óleo de neem tem sido utilizado na medicina popular para tratar diversos tipos de doenças, em especial as doenças de pele, pois reduz a inflamação e acelera a cicatrização da pele danificada, auxiliando no combate a catapora, erupções cutâneas, feridas, micoses, acnes, caspas entre outras (MOSSINI & KEMMELMEIER, 2005).

O seu óleo pode ser utilizado como repelente para o *Aedes aegypti* com tempo de proteção de até 300 minutos. Misturas com outros repelentes podem potencializar a sua ação MUKESH *et al* (2014), apud Oliveira (2015). Além do seu potencial uso no combate ao *Aedes aegypti*, é verificado na literatura seu uso no combate ao vetor da malária.

Ainda em relação ao uso do neem, estudos também comprovam que infecções odontológicas estão sendo tratadas utilizando-se tradicionalmente componentes isolados de partes do neem (ARAÚJO *et al.*, 2010).

Vê-se assim, que, conforme discorre Martinez (2002), o plantio do neem vem crescendo rapidamente no Brasil, não somente com o objetivo de exploração da madeira, mais, também, para a produção de folhas e frutos, de onde se retira a matéria prima para produtos inseticidas, uso medicinal, veterinário ou na indústria de cosméticos.

2.3 Toxicidade reprodutiva do neem

Está bem documentado na literatura que o neem pode apresentar toxidade reprodutiva, por interferir negativamente na reprodução de machos e/ou fêmeas (CARVALHO *et al.*, 2015; BRASIL, 2013; DAFALLA *et al.*, 2012; SILVA, 2010).

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. As alterações histopatológicas testiculares em animais alimentados com sementes de neem também foram

evidenciadas por Dafalla *et al.* (2012), no qual foi registrado degeneração das células do epitélio germinativo de ratos tratado com 130mg de extrato aquoso de sementes de neem durante 14 dias. Os autores concluíram que o extrato de sementes de neem possui toxicidade dose-dependente e efeitos adversos da antifertilidade e que a utilização do extrato e seus produtos para fins terapêuticos pode não ser considerado seguro.

A aplicação de única dose de 50 µL do óleo de neem no canal deferente, em ratos Wistar, provocou, após duas semanas do tratamento, interferência na espermatogênese e, depois de quatro semanas, drástica redução do epitélio dos túbulos seminíferos, com completo bloqueio da espermatogênese, levando os animais à infertilidade por um período de nove meses (UPADHYAY *et al.*, 1993). O efeito de extrato aquoso de folhas de neem em ratos nas doses de 20, 40 e 60 mg/kg provocou retenção espermática e efeitos adversos na espermatogênese, lesões no espermatozoide e no epidídimo, diminuição do peso da vesícula seminal e da próstata, interferindo na liberação da testosterona (SANTRA; MANNA, 2009).

Khillare & Shrivastav (2003), com doses de 1 a 50 mg de extrato aquoso de neem, observaram que os espermatozoides humanos foram mortos com menos de 20 segundos de exposição à droga. Os danos provocados nos espermatozoides pela ação espermicida do neem envolvem diminuição da motilidade progressiva, deslocamento lateral da cabeça e danos na parede celular do acrossoma do espermatozoide (SHARMA *et al.*, 1996).

A diminuição da produção de espermatozoide é acompanhada de aumento proporcional de espermatozoides anormais, e isso mostra que a inclusão de folhas de neem na dieta de coelhos prejudicou a estrutura das células espermatogênicas durante o processo de espermatogênese ou da ejaculação (OGBUEWU *et al.*, 2009b), uma vez que os autores verificaram que a inclusão de 10 e 15% de farinha de folhas de neem na alimentação de coelhos durante 16 semanas reduziu a qualidade do sêmen e o peso testicular, evidenciando assim, que os compostos químicos contidos nas folhas de neem diminuem o número de túbulos seminíferos, a quantidade das células de Leydig e de Sertoli e a quantidade de células espermatogênicas.

Ainda se reportando a estudos realizados com coelhos, Gowda *et al.* (1996), *apud* Brito (2013) perceberam que a inclusão de 50 e 100% de torta de neem, tratada com 2% de ureia ou 1,5% de hidróxido de sódio, na dieta de coelhos durante 18 semanas provocou mudanças nos testículos, mostrando leve desorganização das espermatogônias em dietas com

50% de inclusão. Para dietas com 100% de inclusão, os testículos exibiram variável grau de degeneração das espermatogônias e interrupção do seu arranjo ordenado, alguns túbulos com forma irregular e reduzido número de espermatozoide .

O óleo de neem quando aplicado intravaginalmente antes do acasalamento, promoveu inibição da gestação em ratos, macacos e humanos por promover efeito espermicida (SILVA, 2010). Os efeitos espermicidas também foram observados por Garg *et al.* (1993), que constaram alta eficácia anticonceptiva de pomada de neem intravaginal em coelhas e macacas. Quando aplicado dentro do útero, o óleo de neem impediu o embrião de se fixar no endométrio, promovendo a diminuição do receptor de crescimento epidérmico no lúmen e no epitélio glandular, provocando grande infiltração de leucócitos no útero, degeneração do embrião e consequentemente reabsorção embrionária (SILVA, 2010).

Fêmeas de ratos acasaladas com machos que receberam 1,0 mL de extrato aquoso de neem durante um mês, reduziram o número de prenhez e da ninhada (DESHPANDE *et al.*, 1980). A aplicação intrauterina de 100 µL de óleo de neem no período de pré-implantação agiu bloqueando a prenhez no lado da aplicação, devido à redução na implantação, degeneração e reabsorção de embriões, sem afetar estas estruturas no corno contralateral. Também não mostrou efeito adverso sobre a foliculogênese e ovulação, notou-se ainda que o corno tratado não apresentou mudanças patológicas, mantendo-se receptivo à ação dos hormônios (UPADHYAY *et al.*, 1990).

Já Kasturi *et al.* (2002) *apud* Silva (2010) observaram toxicidade reprodutiva induzida pelo uso do neem e verificaram alterações ultraestruturais nos testículos de ratos albinos, mediante propriedades antiespermatogênicas e antiandrogênicas, interferindo assim na espermatogênese.

Shaikh *et al.* (2009) verificaram que óleo de neem modifica a estrutura dos ovários, altera a fertilidade e contribui para o aumento dos níveis séricos do FSH, interferindo, assim, no processo maturativo e consequentemente no crescimento dos folículos ovarianos, além de reduzir os teores séricos de LH e progesterona, produzindo assim uma provável esterilidade na fêmea.

A literatura ainda mostra que a administração oral do óleo também provoca alterações reprodutivas em fêmeas de *Rattus norvegicus*, com diminuição da progesterona, modificação

histopatológica no útero e atraso no retorno à prenhez, e não permite a implantação plena dos embriões, possivelmente devido ao seu efeito sobre o sistema imunitário (MOROVATI *et al.*, 2008 *apud* BRITO, 2013).

Outras análises realizadas por Dehghan *et al.* (2005) *apud* BRITO (2013), constataram que a atividade da enzima ATPase na cabeça e na cauda de espermatozoides localizados no epidídimo, reduziu de forma significativa com a administração de extrato alcoólico de semente de neem na dose de 100 mg/kg de peso vivo em ratos. Sharma *et al.* (1996) atribuem a redução na taxa de fertilidade à diminuição da motilidade da cauda do espermatozoide e às suas alterações morfológicas, sendo que essa menor motilidade dos espermatozoides está relacionada aos prejuízos provocados pelo neem na atividade das mitocôndrias situadas na peça intermediária, segundo Patil *et al.* (2009) *apud* Brito (2013).

Considerando os estudos e experimentos desenvolvidos até então acerca do neem, vê-se que ele se destaca por suas diversas propriedades o que permite seu uso na agricultura, medicina humana e veterinária, indústria cosmética, em sistemas agroflorestais e preservação do solo, contudo, evidenciado seu poder anticonceptivo, segundo Brito (2013), essa propriedade não pode ser ignorada quando destinado ao uso em animais de produção. Nesse sentido, estudos se fazem necessários para obtenção de dados que suportem seu uso sem riscos maiores para humanos, animais domésticos, e principalmente silvestres, como aves que vêm na semente do neem uma potencial fonte de alimento.

2.4 Aspectos biométricos, morfológicos e degenerativos testiculares

Os testículos são as gônadas sexuais masculinas responsáveis pela produção de espermatozoides e andrógenos. Apresentam-se em par, de formato oval ligeiramente achatado e possui no seu córtex uma cápsula de tecido conjuntivo chamada túnica albugínea que penetra no interior do órgão (mediastino testicular) formando lóbulos e estes, por sua vez, contém vários túbulos seminíferos. O parênquima testicular é formado por um tecido conjuntivo frouxo, nervos, vasos linfáticos e sanguíneos, assim como células intersticiais e de sustentação (PIMPÃO *et al.*, 2005).

Existe um grande número de pesquisas relacionando características biométricas testiculares com potencial reprodutivo em virtude da correlação positiva do peso, comprimento e largura dos testículos com a produção espermática e portanto, com a

fertilidade (BERTOL *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2012; LOUVANDINI *et al.*, 2008). A capacidade reprodutiva das aves machos pode ser predefinida de acordo com a capacidade para produzir sêmen, e o determinante principal desta qualidade é o tamanho do testículo (STEIN, 2014). Sendo assim, a redução no peso dos testículos normalmente está associada à redução na espermatogênese e dos níveis de testosterona e consequentemente redução da capacidade reprodutiva das aves (LANA *et al.*, 2013).

A morfometria testicular é uma análise microscópica qualitativa do ciclo do epitélio seminífero. Sua avaliação é essencial no estabelecimento do padrão de divisão e renovação das espermatogônias e permitir estimativas da eficiência do processo espermatogênico (ARAÚJO, 2008). Dentre os parâmetros morfométricos testiculares, o diâmetro do túbulo seminífero e a altura de epitélio seminífero são mais frequentemente utilizados, uma vez que, também estão relacionados com o potencial reprodutivo, em virtude da correlação positiva com a eficiência do processo espermatogênico, produção de grande número de espermatozoides e consequentemente maior fertilidade (MORAIS *et al.*, 2012).

As análises histopatológicas têm sido amplamente utilizadas para identificar a natureza, a gravidade e a extensão das lesões produzidas por compostos bioativos presentes nas folhas, caule, fruto e sementes de plantas (GARCIA, 2017; SILVA *et al.*, 2000). A degeneração do epitélio seminífero constitui a causa mais comum e importante de declínio da fertilidade de um macho, sendo um achado histológico típico de um processo de deterioração do parênquima testicular, provocado por processos infecciosos específicos do sistema reprodutor, fatores nutricionais, medicamentosos e substâncias tóxicas presentes em plantas (GARCIA, 2017). Algumas substâncias tóxicas presentes em plantas, como por exemplo, o gossipol, composto polifenólico contido em quantidade expressiva na semente de algodão, pode provocar quadro grave de degeneração testicular em ruminantes, menor número de células que compõe os túbulos seminíferos e redução da qualidade espermática (GADELHA *et al.*, 2011).

3- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adição de 20% e 40% de sementes de neem na dieta de codorna durante 60 dias, foi capaz de interferir negativamente nos parâmetros biométricos testiculares, causando um quadro degenerativo acentuado nas células germinativas, alterando os parâmetros morfométricos testiculares e reduzindo a qualidade do sêmen.

4 REFERÊNCIAS

ALZOHAIKY, M.A. Therapeutics **Role of Azadirachta indica (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment.** Journal List Evid Based Complement Alternat Medv, 2016.

ARAÚJO, B.M. **Morfometria testicular em ratos wistar adultos tratados com paracetamol (acetaminofeno).** Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

ASSUNÇÃO, P.S. **Utilização da torta de neem (Azadirachta indica) como antimicrobiano em rações de frangos de corte.** Dissertação de mestrado - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, GO, 2016.

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(2): p.249-255. 2015.

BERTOL, M.A.F.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; ABREU, A.C.M.R. **Características biométricas e parâmetros espermáticos de testículos e epidídimos direitos e esquerdos de touros zebuínos.** Archives of Veterinary Science v.20, n.2, p.X-X, 2015.

BEVILACQUA, A.H.V.; SUFFREDINI, I.V.; BERNARDI, M.M. **Toxicidade de Neem, Azadirachta indica A. Juss. (Meliaceae) em Artemia sp: comparação da preparação comercial e o óleo puro.** Revista Instituto Ciência Saúde. p. 157-60, 2008.

BONALDI, R.A.; HASSE, L. **Flora arbórea da arborização urbana da cidade de Paranaguá, Paraná, Brasil.** REVSBAU, Piracicaba – SP, v.11, n.4, p. 01-17, 2016.

BRASIL, R.B. **Aspectos botânicos, usos tradicionais e potencialidades de Azadirachta indica (Neem).** Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17, 2013.

BRASIL, R.B. **Estudo fitoquímico e Atividade Fungicida do Extrato Metanólico das Folhas de Azadirachta indica (A. Jusseu).** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Pará, 2010.

BRITO, O.S. **Efeitos do óleo de Nim (Azadirachta indica A. Juss) sobre a reprodução e perfil metabólico de machos ovinos.** Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa, 2013.

CARPANEZZI, A.A.; NEVES, E.J.M. Balanço dos aspectos técnicos do cultivo do nim no Brasil. Dados eletrônicos. - Colombo : Embrapa Florestas, 2010.

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.

CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia., v. 62, n.3, p. 536-543, 2010.

CLAVIJO, M.U.; MEDINA, L.F.O.; GOMEZ, A.M.A.; MANCERA, F.M.C.; JARAMILLO, A.P.C.; MAYA, W.D.C. Espermicidas: Una Alternativa de Anticoncepción para Considerar. Revista Tecnológicas. n 28, pp. 129-145, 2012.

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.

DESHPANDE, V. Y.; MENDULKAR, K.; SADRE, N. L. Male antifertility activity of Azadirachta indica in mice. J. Postgraduate Medicine's., v. 26, p. 167, 1980.

GADELHA, I.C.N.; RANGEL, A.H.N.; SILVA, A.R.; SOLTO-BLANCO, B. Efeitos do gossipol na reprodução animal. Acta Veterinaria Brasilica, v.5, n.2, p.129-135, 2011.

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.

GARG, S.; TALUJA, V.; UPADHYAY, S. N.; TALWAR, G. P. Studies on the contraceptive efficacy of Praneem polyherbal cream. Contraception, v. 48, p. 591-596, 1993.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica – Texto e Atlas. Ed:12ª. Rio de Janeiro: Guanabara. 524p. 2013.

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

LANA, L.L.; SOARES, F.A.; SANTOS, T.M.; OLIVEIRA, J.N.; MARQUES JUNIOR, A.P. Índice gonadosomático e correlações entre dimensões e peso

testiculares na codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) aos 60 dias de idade. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia, v.65, n.4, p.955-960, 2013.

LIPINSKI, L. C. et al. Avaliação do efeito anti-helmíntico e das alterações metabólicas em búfalos (*Bubalus bubalis*) com administração da torta de 20ap e do alho desidratado no Sul do Paraná. Revista Brasileira de Agroecologia,, v. 6, n. 3, p. 168-175, Porto Alegre 2011.

LOUVANDINI, H.; MCMANUS, C.; MARTINS, R.D.; LUCCHI, C.M.; CORRÊA, P.S. Características **biométricas testiculares em carneiros Santa Inês submetidos a diferentes regimes de suplementação protéica e tratamentos anti-helmínticos.** Ciência Animal Brasileira, v. 9, n. 3, p. 638-647, 2008.

MACEDO, F.R. Efeitos da administração da folha de nim indiano (*azadirachta indica a.juss*) no controle de helmintos em ovinos infectados naturalmente. Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2007

MACHADO, P. P. et al. Modelos matemáticos e correlações de medidas morfométricas testiculares de bovinos zebuínos e azebuados abatidos em São Luís, MA. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 36, n. 1, p. 51-61, Belo Horizonte, 2012.

MANORANJITHAM, M.P.; ANANDHI, A.P.; SAMPATHRAJ, R.;VANITHAKUMARI, C. Alteration in testicular histoarchitecture following neem oil administration in albino rats. World Neem Conference, India. p. 1165–1172, 1993.

MARTINEZ, S. S. O nim *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2002. 142 p

MICHELETTI, S.M.F.B.; VALENTE, E.C.N.; SOUZA, L.A.; DIAS, N.S.; ARAÚJO, A.M.N. Extratos de Plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em Laboratório. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,, v. 18, n. 4, p.44 a 48, Jaboticabal, 2010.

MORAIS, M.R.P.T.; VELHO, A.L.M.C.S.; DANTAS, S.E.S.; FONTENELENETO, J.D. Morfofisiologia da reprodução das aves:desenvolvimento embrionário, anatomia e histologia do sistema reprodutor. Acta Veterinaria Brasilica, v.6, n.3, p.165-176, 2012.

MOSSINI, S.A.G & KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. Revista Acta farmacéutica bonaerense- vol. 24 nº1 . 139-148 - ano 2005.

OGBUEWU, I. P.; OKOLI, I. C.; ILOEJE, M. U. Effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf meal on serum metabolite profiles of male rabbits. Revista UDO Agrícola, v. 9, n. 4, p. 986-991, Venezuela, 2009a.

OGBUEWU, I.; OKOLI, I. C.; ILOEJE, M. U. Semen quality characteristics, reaction time, testis weight and seminiferous tubule diameter of buck rabbits fed neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf meal based diets. Iranian Journal of Reproductive Medicine, v. 7, n. 1, p. 23-28, 2009b.

OLIVEIRA, R. A polêmica do nim da região dos Inhamuns. Tropical Garden, Tauá. 2009.

OLIVEIRA, R.B.; GODOY, S.A.P.; COSTA, F.B. Plantas tóxicas. Conhecimento e prevenção de acidentes. 64p. Ribeirão Preto: Holos, 2003.

PAES, J.B.; SOUZA, A.D.; LIMA, C.R.; SANTANA, G.M. Rendimento e Características Físicas dos Óleos de Nim (*Azadirachta indica*) e Mamona (*Ricinus communis*). Floresta e Ambiente 22(1):134-139, 2015.

PAES, J.B.; SOUZA, A.D.; LIMA, C.R.; MEDEIROS, P.N. Eficiência dos óleos de nim (*Azadirachta indica*) e de mamona (*Ricinus communis*) na proteção da madeira de sumaúma (*Ceiba pentandra*) contra cupins xilófagos em ensaio de preferência alimentar. Revista Árvore; 35(3): 751-758. 2011.

PIMPÃO, C.T.; ROCHA, R.M.V.M.; SCHAEFER, R.; WOUK, A.F.P.F.; CIRIO, S.M.; BENATO, E.M. et al. Avaliação dos efeitos toxicológicos da ivermectina em cães. Arch Vet Sci. 3(4):19-24. 2005.

RIET-CORREA, F.; BEZERRA, C.W.C.; MEDEIROS, R.M.T. Plantas tóxicas do Nordeste. Sociedade Vicente Pallotti. Patos-PB, 2011.

ROSA, M.F.; PACHECO, M.R.; GIRARD, A.M.; SILVA, M.H.M.; SANTOS, E.; ARTONI, S.M.B. Determinação da Ação Hipoglicemiante da *Azadirachta indica*, A. Juss (Neem) Aclimatada no Brasil. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. Ano VIII- N. 15, 2010.

SANTRA, K. B.; MANNA C. K. Antifertility effect of leaf extract of neem (*Azadirachta indica*) on the male wild Indian house rat (*Rattus rattus*). Pharmacologyonline, v. 2, p. 1025- 1037, 2009.

SAS - Statistical Analysis System. SAS/STAT user's guide, version 8.0. Cary, 2002.

SCHUMACHER, M.; CERELLA, C.; REUTER, S.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. 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, 6: 149-160, 2011.

SHARMA, S. K.; SAIRAM, M.; ILAVAZHAGAN, G.; DEVENDRA, K.; SHIVAJI S. S.; SELVAMURTHY, W. Mechanism of action of NIM-76: a novel vaginal contraceptive from neem oil. Contraception, v. 54, n. 6, p. 373-8, 1996.

SILVA, D.R.; MOURA, M.I.; MIGUEL, M.P.; SILVA, L.A.F.; MATOS, M.P.C.; MOURA, V.M.B.D. Avaliações histológica e histomorfométrica de testículos de bovinos com dermatite digital. Ciência animal brasileira. vol.14 no.3 Goiânia, 2013.

SILVA, V.C.L. Avaliação da toxicidade reprodutiva de ratas wistar submetidas à ingestão do extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Dissertação de mestrado - Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE. 2010.

SILVA, R.M.; FURLAN, A.C.; TON, A.P.S.; MARTINS, E. N.; SCHERER, C.; MURAKAMI, A.E. Exigências nutricionais de cálcio e fósforo de codornas de corte em crescimento. Revista Brasileira de Zootecnia, v.38, n.8, p.1509-1517, 2009.

SILVA, M.A. Gossipol em ratas gestantes: toxicidade materna e avaliação testicular dos filhotes. Dissertação de mestrado - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2000.

SOARES FILHO, C.V.; ROSA, P.R.B.; COSTA, R.L.D.; ESPADA, J.C.P. Óleo de Neem (*Azadirachta indica*) nos parâmetros parasitológicos, hematológicos e bioquímicos de ovinos naturalmente infectados por nematoides gastrintestinais. Revista Brasileira Saúde Produção Animal. v.16, n.2, p.408-419. Salvador, 2015.

SOARES, F.P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R.C.; OLIVEIRA, L.M.; PAIVA, P.D.O.; SILVA, D.R.G. Cultivo e usos do nim (*Azadirachta indica* A. Juss). Boletim Agropecuário - n.º 68 - p. 1-14. Lavras/MG, 2012.

STEIN, G.G. Determinação do ciclo reprodutivo de papagaio-de-peito-roxo *Amazona vinacea* (kuhl, 1820) (aves: psittacidae) por meio de mensuração de metabólitos hormonais utilizando um método não invasivo. Dissertação de mestrado - Universidade Federal Do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

UPADHYAY, S. N.; DHAWAN, S.; TALWAR, G. P. Antifertility effects of neem (*Azadirachta indica*) oil in male rats by single intra-vas administration: an alternate approach to vasectomy. Journal of Andrology, v. 14, n. 4, p. 275-281, 1993.

UPADHYAY, S. N.; KAUSHIC, C.; TALWAR, G. P. Antifertility effects of neem (*Azadirachta indica*) oil by single intrauterine administration: a novel method for contraception. Proceedings: Biological Sciences, The Royal Society Stable, v. 242, n. 1305, p. 175-179, 1990.

VIANA, P. A.; PRATES, H.T.; RIBEIRO, P. E. Uso do Extrato Aquoso de Folhas de NIM para o Controle de *Spodoptera frugiperda* na Cultura do Milho. Circular Técnica (EMBRAPA) nº 88 – p. 01-05. Sete Lagoas/MG, 2006.

CAPITULO 1

Toxicidade reprodutiva da semente de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) em codorna macho (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758)

Rayr Cezar de Souza Góis, Leandro Alves da Silva, Tânia Vasconcelos Cavalcante, Robério Gomes de Olinda, Geysa Almeida Viana, Iago Antonio Ananias da Silva, Gabriela Hemylin Ferreira Moura, Hélio de Araújo Júnior, Jael Soares Batista.

RESUMO

Foi avaliada a toxicidade reprodutiva da semente de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) em aves, utilizando a codorna (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) como modelo experimental. Foram testadas 50 codornas, machos, com 90 dias de idade, alimentadas com dietas formuladas a partir de diferentes percentuais de sementes de neem. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo as aves distribuídas em cinco tratamentos, com 10 repetições, sendo cada animal uma unidade experimental. O tratamento I recebeu ração comercial isenta das sementes de neem e os tratamentos II, III, IV e V receberam respectivamente, dieta contendo 5%, 10%, 20%, e 40% de sementes de neem trituradas e misturada a ração. Após 60 dias recebendo ração experimental, foi realizada coleta do sêmen para avaliação da qualidade espermática e em seguida, as aves foram eutanasiadas e os testículos submetidos à avaliação biométrica, histológica, e histomorfométrica. Os dados foram avaliados pela análise de variância e posteriormente aplicado o teste de Tukey a 5%. Os valores médios do peso, comprimento e largura dos testículos esquerdo e direito, reduziu significativamente nos T4 e T5. A análise histológica revelou que as aves pertencentes aos referidos grupos apresentaram degeneração acentuada das células do epitélio germinativo. As mensurações histomorfométricas dos testículos mostraram que os animais do T4 e T5 apresentaram aumento significativo ($P < 0.01$) dos valores médios da espessura da túnica albugínea e redução significativa dos valores do diâmetro dos túbulos seminíferos e da altura do epitélio germinativo nos T4 e T5. Nos referidos tratamentos, houve redução significativa dos valores médios do *volume seminal*, *concentração espermática*, motilidade dos espermatozoides, vigor e viabilidade espermática.

Palavras-chave: Intoxicação experimental. Neem. Aves. Alterações testiculares. Qualidade espermática.

INTRODUÇÃO

O neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) é uma espécie arbórea da família Meliaceae, nativa da Índia, que vem sendo utilizada há séculos para os mais variados fins, sendo atualmente cultivado em vários países da África, Austrália e América Latina (SOARES FILHO *et al.*, 2015). Esta espécie foi introduzida no Brasil em 1986 por meio do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR com o objetivo de desenvolver um inseticida natural (BRASIL, 2013). Por ser resistente à seca, tolerante a maioria das características dos solos, incluindo os rasos, secos, pedregosos e os altamente lixiviados; e por apresentar crescimento rápido, perene, proporcionando assim, boa qualidade de sombra, o neem foi disseminado rapidamente no semiárido do Nordeste brasileiro, sendo atualmente muito usado na arborização de ruas, praças, parques e jardins (AZEVEDO *et al.*, 2015).

O neem desperta interesse devido à sua grande versatilidade quanto ao seu uso. O óleo de neem é utilizado na fabricação de xampu, loções hidratantes, sabonete, condicionadores, óleo para cabelo e tônico capilar (BRASIL, 2010). A árvore produz madeira de excelente qualidade, sendo utilizada para reflorestamento, paisagismo e combate à desertificação (PAES *et al.*, 2011), além de apresentar potencial de uso como suplemento alimentar animal, podendo até mesmo substituir a ração em alguns casos (ASSUNÇÃO, 2016).

Na semente, folha, flor, casca e raiz do neem estão presentes grande número de compostos bioativos, que garantem grande versatilidade quanto ao seu uso (OGBUEWU *et al.*, 2009a). Dentre esses compostos, a azadiractina, encontrada principalmente nas sementes, é considerada de maior importância devido ser responsável pela maioria dos efeitos biológicos (MOSSINI; KEMMELMEIER, 2005). A azadiractina possui efeito antialimentar, tóxico, repelente e contraceptivo para insetos, sendo considerado um bioinseticida de excelente qualidade, tão potente quanto os inseticidas comerciais, além de ser biodegradável, evitando-se assim contaminação do ambiente (GOVINDACHARI *et al.*, 2000). Em relação ao uso medicinal, uma série de propriedades da azadiractina e outros componentes ativos do neem são descritas na literatura, utilizados como: antimicrobiano (PAES *et al.*, 2015), anti-inflamatório (ASSUNÇÃO, 2016), hepatoprotetor (BRASIL, 2013), antitumoral (SCHUMACHER, 2011), antimalárico (ALZOHAIY, 2016), antidiabético (ROSA *et al.*, 2010) carrapaticida (MICHELETTI *et al.*, 2009), antiviral (SOARES FILHO *et al.*, 2015) e vermífugo (LIPINSKI *et al.*, 2011).

Além disso, alguns estudos apontam que o neem tem efeito negativo na função reprodutiva de humanos e animais por promover o declínio dos parâmetros seminais (volume e concentração do ejaculado, motilidade e alterações morfológicas dos espermatozoides),

comprovada ação espermicida e efeito contraceptivo vaginal (BRASIL, 2013; CLAVIJO *et al.*, 2012; SILVA, 2010). Além de interferir no ciclo estral das fêmeas, no desenvolvimento embrionário precoce e promover aborto (SILVA, 2010).

Pouco se sabe sobre a toxicidade do neem indiano em aves domésticas e silvestres. Segundo Brito (2013), embora o neem seja reconhecido por suas diferentes propriedades e formas de uso, o potencial anticonceptivo não pode ser ignorado. Oliveira (2009), alerta para a possibilidade do neem causar esterilidade em algumas espécies de pássaros que se alimentam das suas sementes, uma vez que, no semiárido do Nordeste, essa árvore produz expressivas quantidades de sementes na época da estação seca, quando há pouca disponibilidade de alimentos.

Considerando que o neem provoca efeitos deletérios na fertilidade de animais e insetos, fato comprovado em várias pesquisas, sabendo que há a possibilidade do consumo de sementes do neem promover efeito negativo na reprodução de aves, objetivou-se avaliar o efeito da alimentação com sementes de neem sobre a qualidade seminal, parâmetros biométricos e morfométricos testiculares utilizando codorna (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) como modelo experimental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estudo, foram utilizados 50 codornas, *Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758, machos, com 90 dias de idade e peso médio de 150 g, mantidas no setor de avicultura da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), em gaiolas de arame galvanizado com dimensões de 1,00 m x 0,50 m x 0,20 m de altura, 10 aves por gaiola, equipadas com comedouro tipo calha e bebedouro tipo *nipple*. A alimentação fornecida para todas as codornas antes do início deste projeto, foi ração comercial de reprodução para codornas com 20% de PB, 2730 Kcal EM/Kg, 3,4% de Ca e água "*ad libitum*". Esse experimento foi aprovado pelo Conselho de Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da UFERSA sob o protocolo nº 23091.002959/2016-43.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo as aves distribuídas em cinco tratamentos, com 10 repetições, sendo cada animal uma unidade experimental. O tratamento I recebeu ração comercial isenta de sementes de neem e os tratamentos II, III, IV e V receberam, respectivamente, dieta contendo 5%, 10%, 20%, e 40% de sementes de neem trituradas e misturada a ração. As sementes foram coletadas diretamente das árvores, visualmente maduras e normais, submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar

com temperatura de 40 °C durante cinco dias e em seguida trituradas finamente em triturador (Trapp® TRF400) até a granulometria de partículas menores que 0,6 mm.

Após 60 dias recebendo ração, realizaram-se avaliações das características seminais. Para tanto, coletou-se sêmen da porção distal dos ductos deferentes (próximo à cloaca) de cada ave, com auxílio de uma seringa de um mL (100 UI) seguindo a técnica preconizada por Gopinger *et al.* (2012). Em seguida, foram mensurados o volume do sêmen (μL) em micropipetas, concentração ($\times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$) em câmara hematómica de Neubauer, motilidade dos espermatozoides (%) e vigor espermático (0-5). Além disso, confeccionou-se esfregaços contendo sêmen, corados com iodeto de propídeo, associada ao corante Hoechst 33258 para avaliação da viabilidade espermática, os quais foram avaliados por microscopia de fluorescência com aumento de 200 vezes, conforme o método descrito por Harrison e Vickers (1990).

No final do período experimental, as aves foram eutanasiadas utilizando-se cloridrato de xilazina (2%), anestesia dissociativa com cloridrato de cetamina (10%) e injeção de cloridrato de lidocaína no forame magno. Posteriormente, as aves foram pesadas individualmente com o auxílio de balança de precisão, e submetidas à necropsia. Os testículos foram então removidos da carcaça, avaliados macroscopicamente e fotografados, quando apresentavam achados significativos. Para determinar os parâmetros biométricos, os testículos foram pesados em balança analítica e mensurados com o auxílio de paquímetro digital, obtendo-se os valores referentes ao peso, comprimento e largura. Os testículos foram então fixados em solução Bouin por 72 horas, e em seguida conservados em álcool a 70%. Após fixados, os testículos foram seccionados na porção medial, e os fragmentos foram submetidos à desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, incluídos em parafina para a confecção de cortes em micrótomo a 5mm, os quais foram corados por Hematoxilina e Eosina (HE). As secções histológicas obtidas foram observadas ao microscópio óptico, sendo realizada análise descritiva das alterações histopatológicas.

Para o estudo morfométrico do parênquima testicular, os cortes histológicos foram avaliados utilizando-se microscópio óptico (*Olimpus BX50*), acoplado a uma câmera digital. Foram fotografados aleatoriamente 50 campos por lâmina, com aumento de 200 vezes. As imagens digitalizadas foram analisadas através de *Software Image Pro-plus®* (Media Cybernetics - LP, USA). Foram mensurados os seguintes parâmetros: espessura da túnica albugínea (ETA), diâmetro dos túbulos seminíferos (DTS), e altura do epitélio germinativo (AEG).

Para avaliar possíveis diferenças entre os tratamentos, os dados obtidos dos parâmetros biométricos, morfométricos testiculares e características seminais foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e posteriormente aplicado o teste de Tukey com significância de 5%, utilizando o programa estatístico SAS (2002).

RESULTADOS

O estudo dos parâmetros biométricos testiculares demonstrou que os valores médios de peso, comprimento e largura dos testículos esquerdo e direito, não diferiram significativamente ($P>0.05$) entre T1, T2 e T3. Observou-se redução dos valores médios dos referidos parâmetros nos T4 e T5, e diferença significativa ($P<0.05$) em comparação aos demais tratamentos (Tabela 1).

Os testículos dos animais dos grupos T4 e T5 apresentaram macroscopicamente, notável redução de tamanho, consistência firme e coloração amarelada (Figura 1). Os testículos dos animais dos T1, T2 e T3 mantiveram-se com aspecto morfológico dentro da normalidade observada para a espécie (Figura 2). Quanto às alterações histopatológicas, verificou-se que as codornas pertencentes aos T4 e T5 apresentaram degeneração acentuada das células do epitélio germinativo caracterizado pela presença de células com citoplasma eosinofílico, granuloso, vacuolizados, com núcleos picnóticos (Figura 3). Outro aspecto histológico importante observado nos animais, foi a redução na quantidade de células da linhagem germinativa, sendo que a maioria dos túbulos seminíferos continham apenas uma ou duas camadas de células espermatogênicas e ausência de espermatozoides no lúmen tubular, além da presença de detritos celulares e macrófagos no lúmen. Os animais dos demais tratamentos apresentaram parênquima testicular com aspecto histológico dentro da normalidade, com a presença de túbulos seminíferos com células da linhagem espermatogênica inalterada, em diferentes fases de maturação, além de grande quantidade de *espermatozoides no lúmen tubular* (Figuras 4).

Na avaliação das mensurações histomorfométricas dos testículos, notou-se que os animais do T4 e T5 apresentaram aumento significativo ($P<0.01$) dos valores médios da ETA, e diferença significativa em comparação aos animais dos T1, T2 e T3. Os valores médios do DTS e da AEG não diferiram significativamente ($P>0.05$) entre T1, T2 e T3. No entanto, observou-se redução significativa dos valores dos referidos parâmetros nos T4 e T5.

A análise do sêmen revelou que os valores médios do *volume seminal*, *concentração espermática*, motilidade dos espermatozoides e vigor espermático das codornas pertencentes aos T4 e T5 foi significativamente inferior ($P<0,05$) quando comparado aos valores

observados nos T1, T2 e T3. Da mesma forma, a redução da viabilidade espermática foi significativa nos T4 e T5. O percentual de espermatozoides inviáveis foi de $93\% \pm 3,59$, para o T4 e $94\% \pm 3,59$ para o T5. Entretanto, nos animais dos grupos T1, T2 e T3, foram observados elevados percentuais de espermatozoides viáveis com valores, respectivamente, de $60\% \pm 3,59$, $36,44,07\% \pm 3,59$ e $42,66\% \pm 3,59$.

DISCUSSÃO

O plantio do neem indiano está crescendo rapidamente no Brasil. A árvore está sendo incorporada ao bioma Caatinga de forma incontrolada (AZEVEDO *et al.*, 2015). Está bem documentado na literatura que o neem pode apresentar toxicidade reprodutiva, por interferir negativamente na reprodução de machos e/ou fêmeas (CARVALHO *et al.*, 2015; BRASIL, 2013; DAFALLA *et al.*, 2012; SILVA, 2010). Até a presente data se desconhece a existência de estudos que avaliem a ocorrência de alterações reprodutivas em aves que se alimentam com sementes de neem. Observa-se na literatura, que a maioria dos estudos sobre o assunto é realizado em mamíferos e insetos, necessitando, portanto, de uma descrição mais detalhada envolvendo os aspectos histopatológicos e histomorfométricos do parênquima testicular de aves alimentadas com diferentes percentuais de semente de neem na dieta.

A codorna japonesa apresenta rápido desenvolvimento gonadal, precocidade sexual, alta fertilidade, elevada rusticidade, exigência de pouco espaço para seu confinamento (OTTINGER *et al.*, 1997), assim, escolhemos essa espécie como modelo adotado para o estudo que poderia permitir a simulação do que poderá ocorrer com aves que se alimentam com sementes de neem.

Ficou evidenciado neste estudo, que a adição de 20% e 40% de sementes de neem na ração acarretou redução significativa do peso, comprimento e largura dos testículos. Os parâmetros biométricos testiculares estão relacionados com potencial reprodutivo em virtude da correlação positiva do peso, comprimento e largura dos testículos com a produção espermática e, portanto, com a fertilidade (MACHADO *et al.*, 2012). Segundo Etches (1996) a capacidade reprodutiva de uma ave pode ser definida como a capacidade para produzir sêmen e o determinante principal desta qualidade é o tamanho do testículo. Assim, a redução no peso dos testículos normalmente está associada à redução na espermatogênese e, portanto, na capacidade reprodutiva das aves. Considerando estas observações, é possível sugerir que a ingestão de percentuais maiores que 20% de sementes de neem na ração, é capaz de influenciar negativamente em parâmetros biométricos testiculares indicadores de fertilidade.

Análises histopatológicas têm sido amplamente utilizadas para identificar a natureza, gravidade e a extensão das lesões produzidas por compostos bioativos presentes nas folhas, caule, fruto e sementes de plantas (ASSIS *et al.*, 2013). No presente estudo, o exame histopatológico confirmou o efeito tóxico da semente de neem sobre o parênquima testicular, uma vez que o fornecimento de 20% e 40% de sementes de neem na dieta por 60 dias, promoveu degeneração acentuada das células do epitélio germinativo e ausência de espermatozoides no lúmen tubular. A degeneração do epitélio seminífero constitui a causa mais comum e importante de declínio da fertilidade de um macho, sendo um achado histológico típico de processo atrófico testicular, caracterizado por redução dos parâmetros biométricos testiculares (NASCIMENTO; SANTOS, 2003 GARCIA, 2017). Assim, convém destacar que as codornas dos T4 e T5 apresentaram redução significativa dos parâmetros biométricos testiculares, também apresentaram degeneração testicular, comprovada por exame histopatológico.

Os efeitos tóxicos de sementes de neem no parênquima testicular foram descritos por DEHGHAN *et al.*, (2006). Estes autores observaram desorganização do epitélio seminífero, picnose nuclear e aglutinação dos espermatozoides no epidídimo e no ducto deferente de ratos que receberam dose de 100 mg/kg de extrato alcoólico da semente. As alterações histopatológicas testiculares em animais alimentados com sementes de neem também foram evidenciadas por Dafalla *et al.*, (2012), que registraram degeneração das células do epitélio germinativo de ratos tratados com 130 mg de extrato aquoso, durante 14 dias. Os autores concluíram que o extrato de sementes de neem possui efeitos adversos de antifertilidade e que esse efeito é dose dependente, de forma que a utilização do extrato e seus produtos, para fins terapêuticos, pode não ser considerado seguro.

O estudo histomorfométrico dos testículos constatou que as codornas dos T4 e T5, apresentaram redução significativa do DTS e AEG, além do aumento significativo da ETA, no entanto, as codornas dos T1, T2 e T3 apresentaram parênquima testicular com aspecto histológico dentro da normalidade. A degeneração das células do túbulo seminífero pode resultar em perda de células epiteliais com consequente diminuição da altura do epitélio, do diâmetro dos túbulos seminíferos e do peso testicular (SILVA *et al.* 2013). Dessa forma, os resultados histomorfométricos obtidos no presente estudo, mostraram-se em conformidade com os verificados nas análises biométrica e histopatológica. Os parâmetros histomorfométricos testiculares observados nas codornas dos T4 e T5, foram semelhantes aos observados por Amoroso *et al.* (2008) em codornas japonesas que se encontravam no final da atividade reprodutiva. Estes autores observaram que nesse período, houve redução de células

espermáticas e decréscimo no DTS e AEG, acompanhados do aumento significativo da ETA e por uma rápida redução do peso testicular.

A viabilidade espermática é um dos parâmetros comumente empregado no estudo de avaliação da qualidade espermática e capacidade de fertilização dos espermatozóides (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Esse parâmetro foi avaliado pela observação da integridade da membrana espermática, através da coloração com iodeto de propídeo; agente intercalante fluorescente utilizado como corante de células, que deixam azuis os espermatozoides com membrana intacta, associada a outro corante, o Hoechst 33258, que tornam vermelho os espermatozoides com membrana lesionada. Nessa análise, observamos, que o percentual de espermatozoides viáveis foi alto nos T1, T2 e T3, apresentando 60%, 36,44% e 42,66% respectivamente, e baixos nos T4 e T5 com 7% e 6% respectivamente.

Vimos, portanto, que ao analisarmos o volume, concentração, motilidade, vigor e a viabilidade espermática pertencentes aos T4 e T5, percebemos que todos esses parâmetros se mostraram inferiores em relação aos demais tratamentos, T1, T2 e T3, conforme demonstrado na Tabela 3. Assim, o aumento significativo do percentual de sementes de neem na dieta das aves, resultou em efeito negativo na qualidade seminal.

As referências existentes na literatura atual, não informam sobre o efeito da alimentação com sementes de neem sobre as características seminais em aves. No entanto, a literatura contempla vários estudos nos quais confirmam o efeito deletério do neem nas características seminais em outras espécies. Brito (2013), descreve ação dose dependente com efeito linear decrescente do volume seminal e motilidade dos espermatozoides de ovinos, alimentados com óleo extraído da semente de neem. Ekaluo *et al.* (2011), vem corroborar com essas informações quando trazem que em observações realizadas, o número de espermatozoides foi reduzido significativamente em ratos albinos, tratados diariamente por via intraperitonal durante 15 dias com extrato aquoso de folhas de neem. Auta e Hassan (2016) também relataram comprometimento na motilidade espermática com a administração subcutânea de 10 mg de extrato aquoso da casca do tronco do neem por 35 dias em ratos. Ou seja, não restam dúvidas, em virtude, do que demostram estudos anteriores que o neem compromete a qualidade do sêmem em animais, e isso fica evidenciado quando os resultados obtidos na avaliação dos parâmetros seminais do presente estudo, reforçam as evidências da toxicidade reprodutiva do neem em codorna macho.

CONCLUSÃO

A adição de 20% e 40% de sementes de neem na dieta de codorna durante 60 dias, foi capaz de interferir negativamente nos parâmetros biométricos testiculares, causando um quadro degenerativo acentuado nas células germinativas, alterando os parâmetros morfométricos testiculares e reduzindo a qualidade do sêmen.

REFERENCIAS

ALZOHAIKY, 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.11 2016.

AMOROSO, L., ARTONI, S.M.B., MORAES, V.M.B., PERECIN, D., FRANZO, V.S. , AMOROSO, P. Influência da espermatogênese e dos níveis de testosterona no aspecto reprodutivo de codornas. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 37, p. 61-66, 2008.

ASSIS, T.S., MEDEIROS, R.M.T., RIET-CORREA, F., GALIZA, G.J.N., DANTAS, A.F.M., OLIVEIRA, D.M. Intoxicações por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa das perdas econômicas na Paraíba1. Pesquisa Veterinária Brasileira. v. 30, p. 13-20, 2010.

ASSUNÇÃO, P.S. Utilização da torta de neem (Azadirachta indica) como antimicrobiano em rações de frangos de corte. Dissertação de mestrado - Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, GO, 2016.

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, p. 111-115, 2016.

AZEVEDO, G.T.O.S., NOVAES, A.B., AZEVEDO, G.B., SILVA, H.F. Desenvolvimento de Mudas de Nim Indiano sob Diferentes Níveis de Sombreamento. Floresta e Ambiente. v. 22, p. 249-255. 2015.

BRASIL, R.B. aspectos botânicos, usos tradicionais e potencialidades de Azadirachta indica (Neem). Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer. v. 9, p. 3252, 2013.

BRASIL, R.B. Estudo fitoquímico e Atividade Fungicida do Extrato Metanólico das Folhas de *Azadirachta indica* (A. Jusseu). Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Pará, PA, 2010.

BRITO, O.S. Efeitos do óleo de Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre a reprodução e perfil metabólico de machos ovinos. Tese de Doutorado – Universidade Federal de Viçosa, MG, 2013.

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. *Bragantia*, v. 74, p. 298-306, 2015.

CLAVIJO, M.U., MEDINA, L.F.O., GOMEZ, A.M.A., MANCERA, F.M.C., JARAMILLO, A.P.C., MAYA, W.D.C. Espermicidas: Una Alternativa de Anticoncepción para Considerar. *Revista Tecnológicas*. n 28, p. 129-145, 2012.

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*. v. 1, p. 82-92, 2012.

DEHGHAN, M.H., DARYANI, A., ROBABEH, D. Histological evidence of male potent reproductive sites by Iranian botanical *Azadirachta indica* (neem) seed extract. *International Journal Molecular Medicine and Advance Sciences*. v. 2, p. 7-15, 2006.

EKALUO, U.B., IKPEME, E.V., UDENSI, O., MADUNAGU, B.E., MARKSON, A.A., OMOSUN, G., UMANA, E.J. Anti-fertility activity of aqueous leaf extract of neem (*Azadirachta indica*) in male albino rats. *World Journal of Medical Pharmaceutical and Biological Sciences*. v. 1, n. 1, p. 1-5, 2011.

ETCHES, R.J. Reproducción aviar. *Acribia*. Zaragoza. p.339, 1996.

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

GOPINGER, E., BORELLI, A.S.F., XAVIER, E.G., BONGALHARDO, D.C., DIONELLO, N.J.L., ZANUSSO, J.T., ROLL, V.F.B. Efeito da inclusão de óleo de linhaça na dieta de codornas macho (*Coturnix coturnix coturnix*) sobre características seminais e avaliação biométrica dos testículos. Revista Portuguesa de Ciências veterinárias. v.107, p. 177-181, 2012.

GOVINDACHARI, T.R., SURESH, G., GOPALAKRISHNAN, G., MASILAMANI S., BANUMATHI B. Antifungal activity of some tetranortriterpenoids. Fitoterapia V. 71. P. 317-320, 2000.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane mammalian spermatozoa. Journals of Reproduction & Fertility Ltd. V. 88. P. 343-352. 1990.

LIPINSKI, L. C., MARTINEZ, J.L., LINO, J., SANTOS, M.V.R., FERREIRA, J.N., PFAU, D.R. Avaliação do efeito anti-helmíntico e das alterações metabólicas em búfalos (*Bubalus bubalis*) com administração da torta de neem e do alho desidratado no Sul do Paraná. Revista Brasileira de Agroecologia. v. 6, n. 3, p. 168-175, 2011.

MACHADO, P. P., SOUZA, A.L., REIS, L.F., CHAVES, R.M. Modelos matemáticos e correlações de medidas morfométricas testiculares de bovinos zebuínos e azebuados abatidos em São Luís, MA. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 36, n. 1, p. 51-61, 2012.

MICHELETTI, S.M.F.B.; VALENTE, E.C.N.; SOUZA, L.A.; DIAS, N.S.; ARAÚJO, A.M.N. Extratos de Plantas no controle de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em Laboratório. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,, v. 18, n. 4, p.44 a 48, Jaboticabal, 2009.

MOSSINI, S.A.G., KEMMELMEIER, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica*. A. Juss.): múltiplos usos. Acta Farmaceutica Bonaerense. v. 24, n.1, p.139-148, 2005.

NASCIMENTO, E.F., SANTOS, R.L. Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.137, 2003.

OGBUEWU, I. P., OKOLI, I. C., ILOEJE, M. U. Effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf meal on serum metabolite profiles of male rabbits. Revista UDO Agrícola. v. 9, n. 4, p. 986-991, 2009.

OLIVEIRA, B.M., ARRUDA, R.P., THOMÉ, H.E., MATURANA FILHO, M., OLIVEIRA, G., GUIMARÃES, C., NICHI, M., SILVA, L.A., CELEGHINI, E.C.C. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. Theriogenology. v. 82, p.767-772. 2014.

OLIVEIRA, R. A polêmica do nim da região dos Inhamuns. Tropical Garden, Tauá. 2009. Disponível em:http://web500.com.br/Nim-Site-P/Novidades_Nim_Neem.html

PAES, J.B., SOUZA, A.D., LIMA, C.R., SANTANA, G.M. Rendimento e Características Físicas dos Óleos de Nim (*Azadirachta indica*) e Mamona (*Ricinus communis*). Floresta e Ambiente. v. 22, p.134-139, 2015.

PAES, J.B., SOUZA, A.D., LIMA, C.R., MEDEIROS, P.N. Eficiência dos óleos de nim (*Azadirachta indica*) e de mamona (*Ricinus communis*) na proteção da madeira de sumaúma (*Ceiba pentandra*) contra cupins xilófagos em ensaio de preferência alimentar. Revista Árvore. v. 35, p. 751-758, 2011.

ROSA, M.F., PACHECO, M.R., GIRARD, A.M., SILVA, M.H.M., SANTOS, E., ARTONI, S.M.B. Determinação da Ação Hipoglicemiante da *Azadirachta indica*, A.Juss (Neem) Aclimatada no Brasil. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. v. 3, n. 15, 2010.

SCHUMACHER, M., CERELLA, C., REUTER, S., DICATO, M., DIEDERICH, M. 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, P. 149-160, 2011.

SILVA, D.R., MOURA, M.I., MIGUEL, M.P., SILVA, L.A.F., MATOS, M.P.C., MOURA, V.M.B.D. Avaliações histológica e histomorfométrica de testículos de bovinos com dermatite digital. Ciência animal brasileira. v. 14 n. 3, P. 391-398, 2013.

SILVA, V.C.L. Avaliação da toxicidade reprodutiva de ratas wistar submetidas à ingestão do extrato etanólico das folhas de nim (Azadirachta indica A. Juss). Dssertação de mestrado - Universidade Federal Rural de Pernambuco, PE. 2010.

SOARES FILHO, C.V.; ROSA, P.R.B.; COSTA, R.L.D.; ESPADA, J.C.P. Óleo de Neem (Azadirachta indica) nos parâmetros parasitológicos, hematológicos e bioquímicos de ovinos naturalmente infectados por nematoides gastrintestinais. Revista Brasileira Saúde Produção Animal. v. 16, n. 2, p. 408-419, 2015.

APÊNDICES

Tabela 1 – Valores médios e respectivos desvios-padrão dos parâmetros biométricos dos testículos direito (TD) e testículo esquerdo (TE), e Índice gonadosomático de codornas (*Coturnix coturnix japônica* Linnaeus, 1758), submetidas à dieta contendo diferentes percentuais de sementes de neem (*Azadirachta indica* A. Juss).

Parâmetros	Tratamentos				
	T1	T2	T3	T4	T5
Peso (g) TD	2,48 ± 0,39a	2,38 ± 0,40a	2,10 ± 0,23a	0,80 ± 0,44b	0,77 ± 0,76b
Peso (g) TE	2,40 ± 0,31a	2,42 ± 0,46a	2,12 ± 0,44a	0,82 ± 0,26b	0,80 ± 0,46b
Comprimento (mm) TD	22,97 ± 2,15a	21,85±2,82 a	20,02 ± 2,88a	11,58 ± 1,25b	10,22 ± 2,0b
Comprimento (mm) TE	22,84 ± 2,29a	21,74± 2,44a	20,09± 0,43ba	11,82 ± 1,86b	10,04± 2,23b
Largura (mm) TD	14,97± 0,86a	13,33± 1,50a	13,81 ± 1,30a	7,81 ± 1,44b	6,90 ± 1,24b
Largura (mm) TE	14,52 ± 1,49a	13,00± 1,42a	12,90 ± 0,26a	7,23 ± 1,34b	6,13 ± 0,84b

*Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade para os parâmetros analisados.

Tabela 2 – Valores médios e respectivos desvios-padrão da espessura da túnica albugínea (ETA), diâmetro do túbulo seminífero (DTS) e altura do epitélio germinativo (AEG) do testículo direito (TD) e testículo esquerdo (TE) de codornas (*Coturnix coturnix japônica* Linnaeus, 1758) mensuradas em micrômetros (µm), submetidas à dieta contendo diferentes percentuais de sementes de neem (*Azadirachta indica* A. Juss).

Variáveis	Tratamentos				
	T1	T2	T3	T4	T5
ETA (TD)	11,27 ± 1,60a	11,60 ± 1,83a	11,78 ± 0,744a	19,93 ± 0,88b	20,76± 0,48b
ETA (TE)	11,96 ± 1,53a	11,52 ± 0,21a	11,01 ± 0,88a	20,80 ± 1,24b	21,46± 2,40b
DTS (TD)	324,33 ± 27,86a	224,31 ± 26,84a	174,25 ±19,09ab	108,85 ±12,87b	104,0± 8,71b
DTS (TE)	318,46 ± 8,68a	313,60 ± 15,61a	170,70± 12,29ab	100,16± 10,58b	108,0± 7,22b
AEG (TD)	122,48 ± 5,28a	109,30 ± 3,98a	74,27 ± 4,21ab	51,63 ± 2,76b	51,22± 6,75b
AEG (TE)	118,41 ± 3,74a	113,78 ± 2,11a	73,22 ± 3,95ab	56,97 ± 2,79b	54,67± 4,24b

*Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade para os parâmetros analisado.

Tabela 3 - Média e respectivos desvio padrão dos parâmetros seminais de codornas (*Coturnix coturnix japônica* Linnaeus, 1758), submetidas à dieta contendo diferentes percentuais de semente de neem (*Azadirachta indica* A. Juss).

Variáveis	Tratamentos				
	T1	T2	T3	T4	T5
Volume (µL)	133,33± 2,26 a	104,37± 2,24 a	110,83± 3,33 a	26,0± 2,10 b	25,0± 3,22 b
Concentração (x10 ⁶ /mL)	170,0± 5,44 a	163,33± 3,77 a	121,66± 4,45 a	8,0± 3,77 b	8,0± 4,21 b
Motilidade (%)	79,16± 0,95 a	70,55± 0,78 a	53,33± 0,68 a	20,0± 0,34 b	18,0± 0,93 b
Vigor	4,16±0,32 a	4,0±0,45 a	3,83±0,65	1,0±0,19 b	1,0±0,31 b
Viabilidade	60%	36,44%	42,66%	7%	6%

*Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade para os parâmetros analisado.

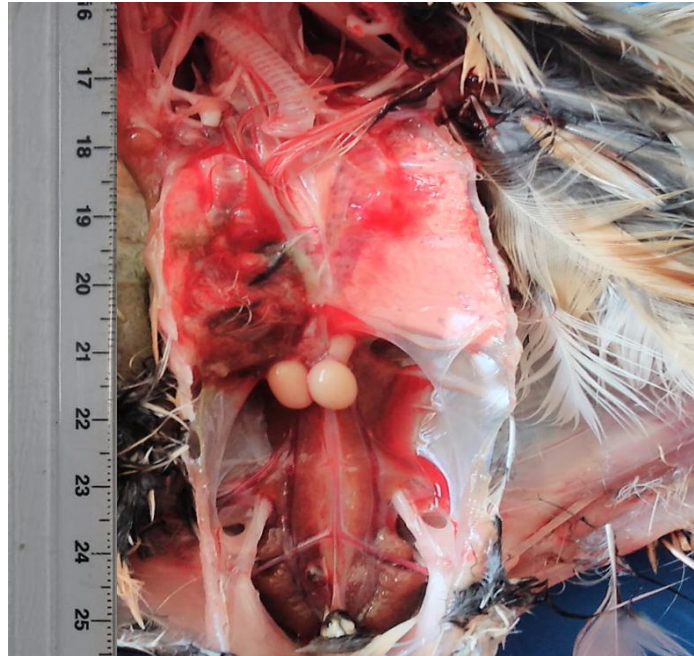


Figura 1. Aspecto macroscópico dos testículos de codornas (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) submetidas à dieta contendo 40% (T5) de sementes de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) evidenciando notável atrofia testicular.

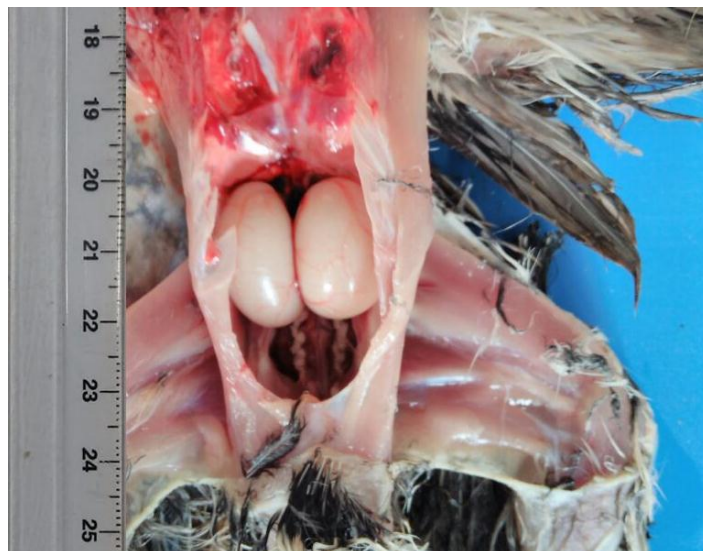


Figura 2. Aspecto macroscópico dos testículos de codornas (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) com dieta isenta (T1) de sementes de neem (*Azadirachta indica* A. Juss), evidenciando aspecto e tamanho normais

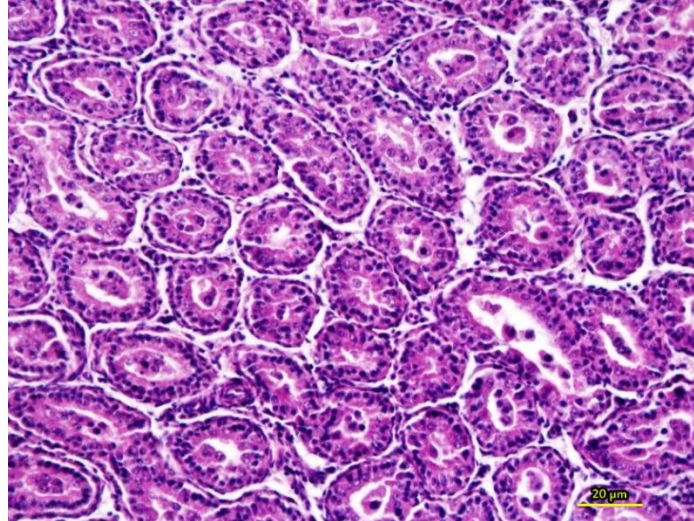


Figura 3. Aspecto histológico do testículo de codorna (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) submetidas à dieta contendo 40% (T5) de sementes neem (*Azadirachta indica* A. Juss), evidenciando túbulos seminíferos de pequenas dimensões, contendo apenas uma camada de células germinativa e ausência de espermatozoides no lúmen tubular. Hematoxilina-Eosina, Obj. 40x.

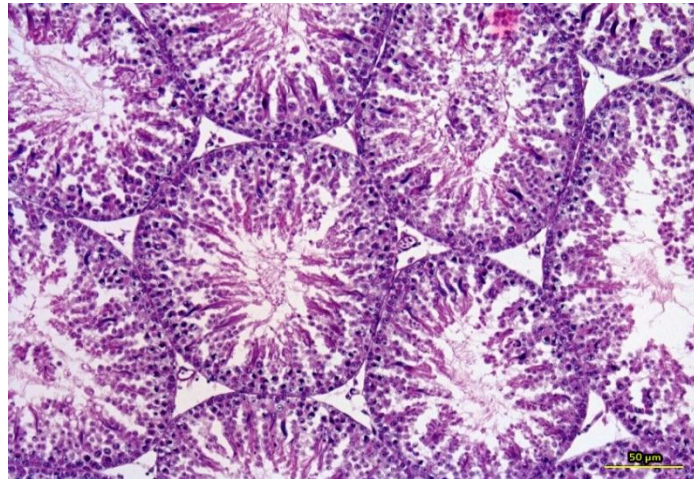


Figura 4. Aspecto histológico do testículo de codorna (*Coturnix coturnix japonica* Linnaeus, 1758) que recebeu dieta isenta (T1) de sementes de neem (*Azadirachta indica* A. Juss), evidenciando túbulos seminíferos de tamanho normal, epitélio germinativo inalterado, em diferentes estágios de maturação, com presença de espermatozóides no lúmen tubular. Hematoxilina-Eosina, Obj. 40x.