

**VANESSA CARLA LIMA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DE RATAS WISTAR  
SUBMETIDAS À INGESTÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS  
FOLHAS DE NIM (*Azadirachta indica* A. Juss)**

**RECIFE**

**2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**VANESSA CARLA LIMA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DE RATAS WISTAR  
SUBMETIDAS À INGESTÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS  
FOLHAS DE NIM (*Azadirachta indica* A. Juss)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador:

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia

**RECIFE**

**2010**

*A minha filha pela sua existência,  
a minha mãe e a minha família  
que me apoiaram em todos os  
momentos da minha vida. Sem  
vocês eu não teria conseguido  
terminar mais esta etapa.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela força que me deu durante esse período da minha vida. Sem ele, a minha vida não teria sentido e eu não teria a força de vontade necessária para desenvolver este trabalho e seguir em frente na certeza de que essa é mais uma etapa vencida e que outras virão em seguida.

A minha pequena Ana Beatriz, por ser a minha fonte inesgotável de estímulo. Filha, mamãe te ama e agradece a Deus pela tua vida.

Ao meu pai querido, apesar de não estar mais aqui entre nós sempre estará em minha vida e em meu coração, pai, obrigada por você ter existido. Obrigada paiinho!

A minha mãe, Sobrinha e minha irmã obrigada por vocês me apoiarem nessa fase tão importante da minha vida profissional e pessoal.

A tia Laine, tio Salvador, tio Felipe, tia Sandra, João Fausto, Dozinho, Laninho, karine, Beto, Narija, enfim aos Lorenzatos de Pernambuco, meu agradecimento e meu reconhecimento pelo apoio e incentivo dado durante toda a minha formação como ser humano. Obrigada mesmo!

A Clodomir, pela colaboração em meu projeto. Obrigada por ter conseguido o material botânico para elaboração do extrato etanólico do nim.

Ao meu orientador professor Fred, meu agradecimento e reconhecimento. Sem o senhor não teria chegado aqui hoje, foi muito importante para mim à oportunidade da sua orientação. Muito obrigada professor!

Ao professor Júnior meu co-orientador, meu agradecimento pela colaboração em meu trabalho. Professor, muito obrigada!

A professora Evilda, meu agradecimento pelo apoio dado durante a residência e durante esse período de mestrado e pelas palavras de apoio e incentivo.

Ao professor Leucio, agradeço a sua gentileza e contribuições dadas durante todo o período do mestrado. Agradeço muito pela sua colaboração.

Professora Tânia agradeço de coração a sua colaboração pela elaboração do extrato etanólico de nim; professora você foi muito importante para o desenvolvimento do meu trabalho.

A professora Isabelle Meunier, meu obrigada pela colaboração na estatística do meu trabalho e pelo aceite de co-orientação. Professora muito obrigada!

A Francine, Sandra Maria, Edmilson Clarindo e a Cristiane agradeço demais a vocês pela colaboração em meu projeto. Foi maravilhoso ter vocês ao meu lado durante a execução deste trabalho. Vocês foram essenciais para o meu êxito! Obrigada gente!

Enfim, agradeço a todos que contribuíram diretamente e indiretamente para a execução deste projeto. Obrigada!

Agradeço o apoio dos amigos que não estão citados, mas me apoiaram em vários momentos difíceis e felizes da minha vida. Obrigada por vocês existirem!

A Facepe pela concessão da bolsa de mestrado. Muito obrigada!

## RESUMO

O nim (*Azadirachta indica A. Juss*) é uma planta da família Meliaceae, sendo bastante utilizada na Índia como anticoncepcional e mundialmente para o controle de insetos. Na medicina veterinária vem ganhando destaque devido às suas propriedades anti-helmínticas e ectoparasiticidas. Objetivou-se nesta pesquisa avaliar os efeitos da administração oral do extrato etanólico do nim em ratas wistar durante o período da gestação e lactação. Foram utilizadas 40 ratas pesando entre 300 a 400 gramas, constitui-se quatro grupos com 10 animais cada, tratados com extrato etanólico das folhas de nim na concentração de 20mg/mL, sendo: Grupo 1 (grupo controle)–ratas tratadas com solução contendo água destilada, Cremophor e dimetilsulfóxido (DMSO) a 10%. Grupo 2–ratas tratadas com 50mg/kg. Grupo 3–ratas tratadas com 100mg/kg. Grupo 4–ratas tratadas com 200mg/Kg. Os animais foram tratados através da administração oral por sondagem orogástrica nos dias 4, 5 e 6 de gestação. Quatro animais foram submetidos à eutanásia no 9º dia de gestação após anestesia dissociativa com xilazina a 2% e quetamina a 10%. Coletaram-se os ovários, embriões e fragmentos de útero. Os mesmos foram pesados, avaliados macroscopicamente e fixados em formol tamponado a 10% para avaliação histomorfométrica. Os seis animais restantes foram tratados também durante 15 dias na lactação e avaliados clinicamente quanto a sinais de toxicidade sistêmica ou reprodutiva. Os neonatos foram pesados, sexados, avaliados diariamente quanto a sinais de toxicidade sistêmica e quanto ao desenvolvimento do sistema nervoso. Os animais dos grupos controle e dos três grupos experimentais não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao número e o peso de embriões implantados. Também não se observou diferença significativa no peso corporal das ratas gestantes e seus lactentes entre os grupos nos períodos avaliados. Da mesma forma, não foram observadas alterações histomorfométricas no útero e nos ovários entre os quatro grupos estudados. O extrato etanólico de nim nas concentrações estudadas não causou qualquer alteração de toxicidade reprodutiva ou sistêmica nos animais tratados no terço inicial da gestação e na lactação e não determinou alterações no desenvolvimento dos filhotes. Assim, conclui-se que o nim nas concentrações estudadas é seguro para utilização no período gestacional e na lactação em ratas.

Palavras-chave: Plantas medicinais, gestação, lactação, reprodução.

## ABSTRACT

Neem (*Azadirachta indica A. Juss*) is a plant of the Meliaceae family. It is commonly used in India as a contraceptive and worldwide as a means of controlling insect proliferation. In veterinary medicine it has been gaining attention due to its anti-helminthic and ectoparasitic properties. This study aims at evaluating the effects of oral administration of the neem's ethanolic extract in wistar rats during pregnancy and lactation. Forty rats weighting between 300 and 400g were randomly selected to make four groups of 10 animals each. These were treated with ethanolic extract of neem's leaves at a concentration of 20mg/mL and divided into the following groups: group 1 (Control)–the rats were treated with a solution containing distilled water, Cremophor and DMSO (Dimethyl Sulfoxide) at 10%. Group 2–the rats were treated with 50mg/Kg. Group 3–the rats were treated with 100mg/kg. Group 4–the rats were treated with 200mg/Kg. The solutions under analysis have been administered via an orogastric catheter in pregnancy days 4, 5 and 6. Four animals in each group, under dissociative anesthesia with xylazine at 2% and ketamine at 10%, have been submitted to euthanasia in gestational day 9 and the ovaries, embryos and uterine fragments have been collected. These have been weighted, evaluated microscopically and fixed in buffered formaldehyde at 10% for histomorphometric examination. The remaining six animals in each group have also been treated during lactation for 15 days and then clinically evaluated for signs of systemic or reproductive toxicity. The neonates have been weighted, sexed, evaluated on a daily basis for signs of systemic toxicity and abnormalities in nervous system development. During the study period, there was no statistically significant difference in terms of numbers and weights of implanted embryos when comparing the control and the experimental group. The same is true regarding body weight of pregnant rats and their lactants. Similarly, no significant histomorphometric difference in the ovaries or uterine fragments has been observed amongst the studied groups. Neem's ethanolic extract in the studied concentrations did not show any systemic or reproductive toxicity in the treated animals during the first third of pregnancy and lactation, nor any developmental abnormalities in the rats offsprings. Therefore, we conclude that neem at the studied concentrations is safety for use in rats throughout pregnancy and lactation.

Key-words: Medicinal plants, pregnancy, lactation, reproduction.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>15</b>
2.1	Nim	15
2.2	Composição química do nim	16
2.3	Propriedades do nim	17
2.4	Desenvolvimento embrionário e fetal	18
2.5	Lactação	19
2.6	Teratologia	20
2.7	Avaliação de toxicidade reprodutiva	20
2.8	Toxicidade do nim em animais e seres humanos	23
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
3.1	Material botânico	24
3.2	Obtenção do extrato	24
3.3	Procedimentos experimentais	25
3.4	Avaliação clínica de toxicidade materna e das proles	27
3.5	Avaliação do desenvolvimento das proles	27
<b>4</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>28</b>
5.1	Dados das progenitoras durante a gestação e lactação	28
5.2	Avaliação da morfologia ovariana e uterina das ratas prenhes	30
5.3	Dados do desenvolvimento dos filhotes	33
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>41</b>



## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Ganho de massa corporal aos nove dias da gestação das ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados aos 4º, 5º e 6º dia de gestação com extrato etanólico das folhas de nim ( <i>Azadirachta indica</i> A. <i>juss</i> ).	<b>28</b>
<b>TABELA 2</b>	Média da massa absoluta dos ovários de ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados nos 4º, 5º e 6º dia de gestação com extrato etanólico das folhas de nim ( <i>Azadirachta indica</i> A. <i>juss</i> ).	<b>28</b>
<b>TABELA 3</b>	Média da massa corporal dos embriões e raiz quadrada da média do número de implantações de ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados nos 4º, 5º e 6º dia de gestação com o extrato etanólico das folhas de nim ( <i>Azadirachta indica</i> A. <i>juss</i> ).	<b>29</b>
<b>TABELA 4</b>	Média da massa corporal em gramas (g) de ratas lactantes do grupo controle e dos grupos experimentais tratados na gestação e durante 15 dias na lactação nas doses de 50, 100 e 200mg/Kg com o extrato etanólico das folhas de nim ( <i>Azadirachta indica</i> A. <i>juss</i> ).	<b>29</b>
<b>TABELA 5</b>	Média da massa corporal das proles das ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados na gestação e por 15 dias na lactação com o extrato etanólico das folhas de nim ( <i>Azadirachta indica</i> A. <i>juss</i> ).	<b>34</b>
<b>TABELA 6</b>	Número total e taxa de sobrevivência de filhotes de ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados na gestação e por 15 dias na lactação com o extrato etanólico das folhas de nim ( <i>Azadirachta indica</i> A. <i>juss</i> ).	<b>34</b>
<b>TABELA 7</b>	Média de tempo do reflexo postural de filhotes avaliados nos 1º e 7º dia de vida das ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados na gestação e por 15 dias na lactação com o extrato etanólico das folhas de nim ( <i>Azadirachta indica</i> A. <i>juss</i> ).	<b>35</b>
<b>TABELA 8</b>	Avaliação da atividade locomotora dos filhotes de mães do grupo controle e dos grupos experimentais tratados na gestação e por 15 dias na lactação com o extrato etanólico das folhas de nim ( <i>Azadirachta indica</i> A. <i>juss</i> ).	<b>35</b>

## LISTA DE QUADRO

<b>QUADRO 1</b>	Dados do desenvolvimento das proles das ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados nas doses de 50, 100 e 200mg/Kg durante a gestação e por 15 dias na lactação com extrato etanólico da folhas de nim ( <i>Azadirachta indica</i> A. Juss).	<b>33</b>
-----------------	---	-----------

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Árvore do nim.	<b>15</b>
<b>FIGURA 2</b>	Molécula da azadiractina.	<b>17</b>
<b>FIGURA 3</b>	Etapas de elaboração do extrato etanólico das folhas de nim.	<b>25</b>
<b>FIGURA 4</b>	Fotomicrografias dos ovários de ratas prenhes do grupo controle e dos grupos experimentais tratados por via oral com extrato etanólico das folhas de nim entre o 4º e 6º dias de gestação.	<b>30</b>
<b>FIGURA 5</b>	Fotomicrografias de úteros de ratas prenhes do grupo controle e dos grupos experimentais tratados por via oral com extrato etanólico das folhas de nim entre o 4º e 6º dias de gestação.	<b>31</b>

## LISTA DE LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>CV</b>	Coefficiente de variação
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal 50%
<b>g</b>	Gramma
<b>Kg</b>	Quilograma
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>p</b>	Nível de significância estatístico
<b>%</b>	Porcentual
<b>®</b>	Marca registrada
<b>s</b>	Segundos
<b>WHO</b>	World Health Organization-Organização Mundial de Saúde

## 1. INTRODUÇÃO

A agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vinculada ao Ministério da Saúde define fitoterápico como medicamento obtido empregando-se exclusivamente matéria-prima vegetal. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Sua eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos de utilização, documentação tecnocientífica em publicações de ensaios clínicos (BRASIL, 2004b).

A fitoterapia é uma forma popular de tratamento de doenças através de plantas medicinais, e por esta razão, mesmo existindo algumas diferenças entre este tratamento e o tratamento farmacológico convencional, ela necessita ser testada cientificamente quanto à sua eficácia e nos seus possíveis efeitos tóxicos. Além disso, as pessoas possuem a crença de que os tratamentos naturais são seguros e não apresentam riscos à saúde, o que é mais um motivo para se intensificar as pesquisas nesta área (FIRENZUOLI e GORI, 2007).

No Brasil, o uso de plantas medicinais é amplamente difundido e a maior parte dos fitoterápicos comercializados é de venda sem prescrição médica. A população que utiliza estes recursos raramente informa o fato aos profissionais da saúde e um dos principais problemas da utilização destes produtos é a crença de que produtos de origem vegetal são isentos de reações adversas e de efeitos tóxicos (GALLO e KOREN, 2001; RATES, 2001).

Gestantes constituem um grupo populacional que culturalmente utiliza as plantas medicinais, por acreditarem que estas não causam danos ao feto ou ao neonato (WEIER e BEAL, 2004).

O nim é uma árvore da família Meliaceae, a qual também pertence o cedro (*Cedrella fissilis* vellozo), o cedro-rosa e a árvore nativa do Brasil chamada Santa Bárbara, que pode atingir até 30 m de altura e viver até 200 anos. Os habitantes da Índia e dos países asiáticos próximos, utilizam o extrato das folhas e o óleo extraído das sementes da árvore de nim há mais de 2.000 anos, como fertilizante de solos e para o controle de pragas agrícola e pecuária, tais como fungos, carrapatos e nematóides (SANTOS e ANDRADE, 2000). Extratos biologicamente ativos obtidos das folhas, frutos, sementes e do tronco do nim são conhecidos pelas múltiplas propriedades terapêuticas inseticida, nematicida e fungicida (MOSSINI e KEMMELMEIER, 2005).

A terapia com as plantas medicinais sofre uma grande restrição quanto ao uso e aceitação, devido ao reduzido número de estudos que comprovem a ação biológica e

segurança, quanto a efeitos tóxicos agudos, crônicos ou sobre a sua atuação na reprodução (SONAGLIO, 1987; SHARAPIN, 1999).

Por outro lado, a regulamentação brasileira exige que medicamentos fitoterápicos tenham sua eficácia e segurança comprovada, inclusive para uso na gravidez e lactação (BRASIL, 1996; BRASIL 2004a).

A literatura já é enfática ao afirmar que esta planta possui propriedades anticonceptivas e espermicidas em ratos, macacos e seres humanos. Alguns escassos trabalhos referem-se à ação tóxica desta espécie vegetal em animais e seres humanos, no entanto muitos aspectos referentes à sua ação ainda precisam ser esclarecidos. Diante desta problemática, esta pesquisa foi conduzida para avaliar os possíveis efeitos tóxicos desta planta medicinal sobre a gestação e lactação em ratas wistar.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Nim

A planta de nome científico *Azadirachta indica* A. Juss é popularmente conhecida por nim (“neem” nos países de língua inglesa) e (margosa ou nimba regionalmente). Foi antigamente conhecida como *Melia azadirachta* L. e tem sido frequentemente confundida com a *Melia azedarach* L., que é a Cereja-chinesa ou o Lilás da Pérsia. É conhecida há séculos, principalmente na Índia, por sua ação medicinal e nas últimas décadas várias pesquisas têm sido realizadas devido às substâncias inseticidas presentes nas folhas e frutos (MARTINEZ, 2002).



Figura 1. Árvore do nim. Fonte: [www.neemdotriangulo.com.br](http://www.neemdotriangulo.com.br)

## 2.2 Composição química do nim

Muitos compostos biologicamente ativos podem ser extraídos das diferentes partes da árvore do nim, incluindo triterpenóides, compostos fenólicos, carotenóides, esteróides e cetonas. Assim como outras meliáceas possuem compostos limonóides com reconhecida ação sobre os insetos, sendo azadiractina, salanina, melantriol e nimbina, os limonóides mais conhecidos. Por esse motivo, a probabilidade de um inseto desenvolver resistência é bastante reduzida, uma vez que inúmeros mecanismos são atingidos ao mesmo tempo (GARCIA, 2000; EPAMIG, 2002). Esses compostos têm grande potencial no controle de pragas, apresentam toxicidade extremamente baixa aos vertebrados, sendo praticamente inócuos, causando baixo impacto ao ambiente (MARTINEZ, 2002). Dentre os mais de 40 terpenóides já identificados na planta que possuem ação contra insetos, a azadiractina é o composto mais eficiente e tem recebido mais atenção dos pesquisadores, por apresentar isoladamente efeitos mais seletivos para os insetos que o extrato de nim com todos os compostos juntos (HOWATT, 1994).

A molécula da azadiractina é muito complexa e ainda não pode ser sintetizada; assim, todos os produtos que contêm azadiractina são produzidos por extração da planta. Os extratos podem ser preparados com a simples trituração das sementes ou frutos frescos, em água, deixando-se a mistura descansar por 12 horas, filtrando-se o líquido e pulverizando-se sobre as áreas infestadas (MARTINEZ, 2006). O mesmo procedimento pode ser usado para folhas frescas ou secas, porém são necessárias concentrações mais altas.

De modo geral, nas concentrações mais baixas de azadiractina, os insetos freqüentemente mostram alterações no desenvolvimento e nas concentrações mais altas pode haver total inibição da alimentação (WARTHEN, 1989). A mortalidade é maior e ocorre mais rapidamente quanto maior for a dose empregada. Além disso, a mortalidade causada pela azadiractina aumenta ao longo do tempo, ou seja, o número de insetos mortos após tratamento continua a aumentar durante todo o seu ciclo de vida. Este efeito indica que a azadiractina pode danificar irreversivelmente determinados processos fisiológicos essenciais para o desenvolvimento do inseto. Os danos indiretos acumulam-se durante os sucessivos estágios de desenvolvimento do inseto, interferindo de forma progressiva e podendo finalmente vir a causar sua morte (MARTINEZ e VAN EMDEN, 2001).

Os compostos bioativos de nim são utilizados na forma de pós, extratos aquosos e/ou orgânicos (metanólico, etanólico, acetônico, clorofórmico, hexânico), óleos, pastas, além de frações parcialmente purificadas e formulações ricas em azadiractina (SAXENA, 1989). O

local de origem, idade das sementes e solvente utilizado na extração, pode ocasionar variações nos teores do princípio ativo e na sua atividade biológica (SCHMUTTERER, 1987).

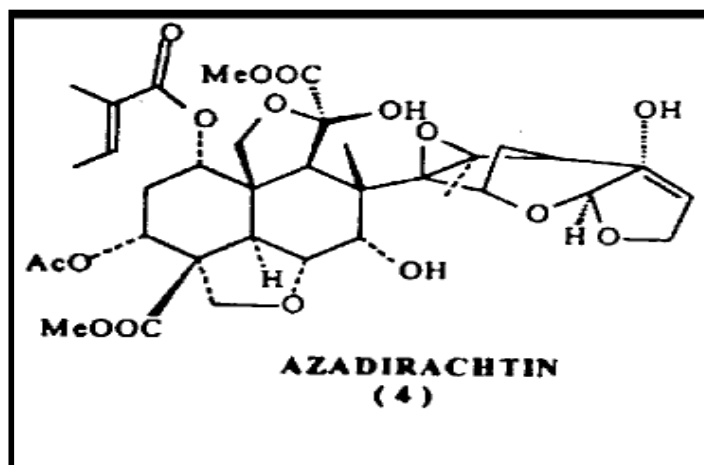


Figura 2. Molécula da Azadiractina. Fonte: BISWAS et al., 2002.

### 2.3 Propriedades do nim

O nim tem sido usado por séculos no oriente como planta medicinal no tratamento de inflamações, infecções virais, hipertensão e mais recentemente como praguicida (MARTINEZ, 2002). Também ocorre em áreas tropicais e subtropicais da África, América e Austrália e durante os últimos 20 anos tem sido introduzida em muitos países, cujos objetivos principais são o reflorestamento, a produção de lenha e também como pesticida natural (SCHMUTTERER, 1987).

As atividades farmacológicas e as aplicações medicinais tradicionais das várias partes do nim, como folhas, cascas e raízes são bem conhecidas, assim como tem sido relatada a aplicação das suas sementes e óleo, para o tratamento de diversas doenças em países como a Índia (BANERJEE et al., 2002). É utilizado na medicina tradicional por suas propriedades antivirais (BADAM et al., 1999), como imunomodulador (RAY et al., 1996), hipoglicemiante (KHOSLA et al., 2000), antineoplásico (BALASENTHIL et al., 1999), protetor hepático (CHATTOPADHYAY, 2003), inibidor da secreção gástrica (BANDYOPADHYAY et al., 2002), espermicida, antifertilizante, antibacteriano e cicatrizante (ROOP, 2005). Também existem compostos que ativam células mediadoras de reações imunes, que ao liberarem citocinas inibe a continuidade e a progressão da gestação (UPADHYAY, 1992). Além das propriedades já citadas, o nim tem apresentado potencial para o controle de fitopatógenos. O



efeito do nim sobre fungos é variável, dependendo dentre outros fatores, como do patógeno alvo (MARTINEZ, 2002).

Na Medicina Veterinária, a utilização do nim no controle de insetos tem demonstrado ser uma alternativa eficiente e segura. Vários insetos como, a *Musca domestica*, *Haematobia irritans*, *Aedes sp*, *Anopheles sp*, entre outros, são difíceis de serem controlados nas propriedades, além de serem vetores de várias doenças, responsáveis por processos alérgicos, infecciosos e parasitários que causam estresse e conseqüentemente diminuição do desenvolvimento e da produção dos animais (FILHO *et al.*, 2008).

O óleo de nim a 10% na dose de 0,6 ml/kg sob aplicações “top spot” a cada cinco dias por um período de 30 dias, mostrou-se eficaz no tratamento do *R. sanguineus*, possibilitando assim o controle de forma natural deste carrapato no cão, sem causar efeitos colaterais (PERPÉTUA *et al.*, 2009).

Ahmed *et al.* (2004) estudaram o efeito do extrato aquoso da semente de nim em nematóides de pequenos ruminantes e demonstraram seu efeito anti-helmíntico. Pessoa (2001) testou os efeitos da azadiractina obtida das sementes "in vitro" na concentração de 1% sobre *Haemonchus contortus* e encontrou 68,3% de inibição na eclodibilidade deste parasita.

#### **2.4 Desenvolvimento embrionário e fetal**

As alterações no desenvolvimento do pré-embrião (fase compreendida entre zigoto e aparecimento da linha primitiva) podem ocorrer devido à lesão direta ou indireta provocada por um agente tóxico. No primeiro caso, a lesão é direta sobre o conceito, e no segundo, pode decorrer de modificação do tempo de transporte até o útero prejudicando a sincronia necessária entre blastocisto e o desenvolvimento do endométrio, impedindo, desta forma, a implantação (ROBLERO, 1987).

O período de desenvolvimento embrionário e fetal consiste em diversas mudanças, sendo estas marcadas por fases. O desenvolvimento de mamíferos pode ser marcado por quatro fases: implantação, organogênese, desenvolvimento fetal e período neonatal. O período de implantação, assim como da organogênese e de desenvolvimento fetal, ocorre em tempos diferentes nas diferentes espécies animais. O período de gestação das ratas segundo Bernardi (1999) é dividido em pré-implantação (dia da concepção até o 5º dia), implantação (5º e 6º dia), organogênese (6º ao 15º dia) e desenvolvimento fetal (16º ao 21º dia).

A implantação bem sucedida de embriões na mucosa uterina compreende uma complexa série de eventos celulares, que se iniciam com a interação do blastocisto com o útero sensibilizado por uma seqüência hormonal adequada de estrógeno-progesterona-

estrógeno (FINN, 1977; ROMAGNANO e BABIARZ, 1990; FARRAR e CARSON, 1992; IWAHASHI et al., 1996; SHARKEY et al., 1996). Para que a implantação tenha sucesso, o embrião deve alcançar um estágio apropriado de desenvolvimento, enquanto que o endométrio deve exibir condição ideal de receptividade para este embrião (ABRAHAMSOHN e ZORN, 1993). Todo o processo de implantação promove profundas modificações no endométrio de várias espécies de roedores, incluindo o camundongo e o rato (FINN, 1977; FARRAR e CARSON, 1992; HURST e PALMAY, 1999). O conjunto destas modificações denomina-se decidualização (ABRAHAMSOHN E ZORN, 1993).

A decidualização, uma das etapas iniciais da implantação embrionária, é um processo altamente regulado, caracterizado também por uma variedade de eventos celulares e moleculares, incluindo: aumento da permeabilidade vascular, aumento da síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA) e hipertrofia, síntese e deposição de componentes da matriz extracelular (FARRAR e CARSON, 1992). Este conjunto de modificações leva à diferenciação do fibroblasto endometrial em células deciduais poliplóides (BANY et al., 2000).

Nos roedores, no início da gestação, os fibroblastos endometriais apresentam-se como células fusiformes, com longos prolongamentos, núcleo grande e ovóide com cromatina frouxa. O contato do blastocisto com o epitélio uterino constitui-se no estímulo mecânico que promove a transformação dos fibroblastos endometriais em células deciduais. A partir do epitélio uterino estimulado, são liberadas diversas moléculas (tais como, prostaglandinas, histamina) que ao interagirem com os fibroblastos endometriais promovem sua diferenciação em células deciduais (DE FEO, 1967; FINN, 1971). A transformação, durante a gravidez, das células do estroma endometrial para células deciduais, é uma resposta normal para a implantação do blastocisto (SPENCER et al., 1998).

## **2.5 Lactação**

A lactação caracteriza a fase final do ciclo reprodutivo de todos os mamíferos sendo fundamental para a sobrevivência, crescimento adequado e desenvolvimento dos neonatos, pois é, na maioria dos mamíferos, sua única fonte de nutrição no período inicial de vida (TUCKER, 1994). O aleitamento materno fornece uma combinação de proteínas, de carboidratos, de minerais e de vitaminas as quais proporcionam vantagens nutricionais e imunológicas às crias (WHO, 2000).

Embora o leite seja fonte de nutrição, muitas substâncias são secretadas através dele, podendo assim, alterar o crescimento, o desenvolvimento e até a sobrevivência do recém-

nascido, por isso a utilização de plantas medicinais na gestação e na lactação deve partir de conhecimentos prévios e ser extremamente cuidadosa (PERALTA, 1983).

## **2.6 Teratologia**

A teratologia se dedica ao estudo das anomalias e malformações ligadas a perturbações do desenvolvimento embrionário ou fetal. Esses defeitos podem ser deformidades, rupturas, displasias ou malformações (HANSEN e YANKOWITZ, 2002). Malformação não significa apenas formação anormal de tecidos, mas também anormalidades bioquímicas. E estas alterações podem ser causadas pela ação direta de um agente tóxico sobre o feto ou através de ação sobre o organismo materno (BERNARDI, 1999).

Teratogenicidade é a indução exógena de anormalidades de desenvolvimento estrutural ocorrida durante a fase da organogênese (NEUBERT et al., 1992; BERNARDI, 1999). Teratogenia é o desenvolvimento de defeitos funcionais ou estruturais não letais no feto. A susceptibilidade a alterações morfológicas aumenta à medida que as camadas germinativas começam a se diferenciar, ocorrendo com maior probabilidade no início da organogênese (fim do primeiro terço da gestação), do que quando órgãos estão diferenciados durante os estágios de clivagem. Os toxicantes usualmente causam a morte dos conceptos (OSWEILER, 1998).

Os estudos de teratogenicidade são realizados em sua grande maioria em animais e fornecem base de triagem para a verificação do potencial teratogênico de um determinado agente, sendo de grande importância para a compreensão dos princípios e mecanismos da teratogênese, contudo nem sempre esses estudos são bem sucedidos devido às diferenças genéticas existentes entre as espécies (SCHARDEIN, 2000).

## **2.7 Avaliação de toxicidade reprodutiva**

A toxicidade reprodutiva está relacionada com qualquer interferência na capacidade reprodutiva, tanto em machos quanto em fêmea, provocada por um agente que produza toxicidade. A avaliação toxicológica é utilizada para analisar resultados experimentais de uma substância química com o objetivo de classificá-la e ao mesmo tempo fornecer informações a respeito da forma correta de seu emprego. Os dados toxicológicos são informações obtidas através da experimentação em animais de laboratórios, em ensaios com microrganismos ou através de registro de casos de intoxicação acidental ocorridos em humanos e animais (LARINI, 1997).

A toxicologia do desenvolvimento estuda os efeitos adversos que ocorrem nos organismos em desenvolvimento, devido à exposição a substâncias químicas antes da concepção, durante o desenvolvimento pré-natal ou pós-natal até a puberdade. A toxicologia do desenvolvimento engloba a teratologia e a toxicologia da reprodução (BARROS e SOLANGE, 1996).

Os efeitos gerados nas fases pré e perinatal podem levar a distúrbios irreversíveis, pois as alterações são produzidas durante a formação ou a diferenciação dos órgãos (NEUBERT et al., 1977; LO e FRIEDMAN, 2002). Pesquisas na área de toxicologia reprodutiva avaliam os efeitos das substâncias químicas utilizadas durante o período pré-natal sobre o desenvolvimento fetal e possíveis efeitos teratogênicos, utilizando animais de laboratório como modelos experimentais (NEUBERT et al., 1977).

Como todos os efeitos tóxicos, os efeitos teratogênicos são dose-dependentes. A redução da dose e da exposição são os métodos mais eficazes de reduzir o risco (NEUBERT, 1992).

Raizada et al. (2001) constataram ausência de efeitos adversos à administração de azadiractina a 12% via oral, em ratos machos e fêmeas prenhes até 1500mg/kg/dia pelo período de 90 dias. Neste trabalho não se verificou sinais farmacotóxicos, teratogênicos, mortalidade, alterações de peso ou alterações dos parâmetros sanguíneos, sendo a dose de 1500mg/kg indicada como dose basal para determinação do nível de ausência de efeitos do composto para calcular sua margem de segurança.

Kazmi et al. (2001) não observaram toxicidade e efeitos adversos, além de ausência de alterações histológicas em órgãos vitais de mamíferos submetidos a tratamento com produtos à base de nim.

Em alguns estudos sobre a toxicologia reprodutiva com a *Azadirachta indica* foi demonstrado efeito antifertilizante e no desenvolvimento da prenhez em roedores (SINHA et al., 1984; LAL et al., 1986; RIAR et al., 1988) e efeito abortivo em ratas e primatas (MUKHERJEE e TALWAR, 1996; MUKHERJEE et al., 1996).

Na árvore do nim, encontram-se ainda componentes com atividades espermicidas (RIAR et al., 1990; GARG, 1994). Também existem compostos que ativam células mediadoras de reações imunes, liberando citocinas que interrompem a progressão da gestação (UPADHYAY et al., 1992).

A utilização do extrato purificado de sementes de nim em ratas wistar, foi estudada através da administração oral durante três dias consecutivos. A confirmação da gestação ocorreu no sétimo dia, por meio de laparotomia e as administrações ocorreram nos dia 8, 9 e

10 de gestação. Observou-se uma redução no número de implantações embrionárias, entretanto após o término do tratamento, os animais recuperaram a fertilidade apresentando ciclos estrais fisiológicos, não sendo identificada nenhuma mortalidade ou morbidade. Observou-se também desenvolvimento normal da progênie e não houve efeito residual nas funções reprodutivas (MUKHERJEE e TALWAR, 1996).

O óleo de nim apresenta propriedades antifertilizantes quando aplicado localmente na vagina ou no útero antes ou após o acasalamento. Em humanos, macacos e ratos promove inibição da gestação quando aplicado intravaginalmente antes do cruzamento (SINHA et al., 1994). O óleo de nim causa inibição da fertilização *in vivo* quando aplicado intracervicalmente antes do acasalamento e inibição da fertilização *in vitro* em ratos (JUNEJA et al., 1994). Esta propriedade contraceptiva é atribuída ao efeito deletério nos espermatozoides e oócitos (SINHA et al., 1994). A aplicação do óleo de nim após o acasalamento, no período de pré-implantação, promove interrupção da gestação (SINHA et al., 1984). O tratamento intrauterino com óleo de nim, durante a fase de pré-implantação, após o acasalamento, promove o bloqueio da fertilidade pelo decréscimo do receptor do fator de crescimento epidérmico no lúmen e no epitélio glandular, causando infiltração maciça de leucócitos no útero, degeneração precoce dos embriões e reabsorção embrionária pós-implantação (JUNEJA et al., 1996).

Em um trabalho onde foi pesquisado o efeito da administração do óleo de nim nas doses de 25 e 50mg/kg durante oito dias consecutivos em ratos machos observou-se significativo decréscimo na contagem espermática, redução no peso do epidídimo, alteração estrutural e na função espermática desses animais (MANORANJITHAM et al., 1993; SAMPATHRAJ et al., 1993).

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

Atualmente, o uso indiscriminado de rodenticidas tóxicos para controlar populações de roedores criou sérios problemas, como a resistência e a contaminação ambiental. Portanto, torna-se necessária a utilização segura e ecologicamente correta de substâncias que ao ser metabolizadas não contaminem o ambiente e que não interfiram com o potencial reprodutivo, particularmente o crescimento e diferenciação dos folículos. Baseado nisto, um estudo foi realizado para investigar os aspectos quantitativos do desenvolvimento folicular em ratas albinas na fase reprodutiva a partir da administração oral de extrato metanólico e hexânico de sementes de *A. indica* (doses de 3 e 6mg/kg) e *M. azedarach* (cinamomo) na dose de

24mg/kg. Verificou-se redução significativa no número normal de folículos, bem como nos folículos em vários estágios do desenvolvimento folicular em todos os grupos tratados (ROOP, 2005).

Os efeitos da administração oral do extrato metanólico das folhas de nim sobre a morfologia dos ovários, bem como os efeitos sob os níveis séricos de hormônio folículo estimulante (FSH) e Hormônio luteinizante (LH), foram estudados em ratas wistar. Os grupos testados foram tratados com 200 e 400mg do extrato metanólico durante 14 dias, não sendo observadas alterações histopatológicas e nem diferença estatística significativa nos níveis de FSH entre os grupos tratados. Contudo, ocorreu redução nos níveis de LH o que pode comprometer a produção e liberação dos oócitos durante o período ovulatório e conseqüentemente a fertilidade das fêmeas (OWOLABI, 2008).

Numa pesquisa onde ratas receberam por via oral 1mg/Kg de extrato alcoólico das flores de nim do 1º ao 5º dia de gestação, observou-se diarreia em todos os animais e uma redução de 6,46% na massa corporal desses animais. Neste mesmo trabalho foi avaliada a influência deste extrato sobre o ciclo estral de ratas tratadas com 1000mg/Kg durante 21 dias e constatou-se que houve prolongamento da duração do diestro e conseqüentemente diminuição da freqüência do estro. Com isso, houve redução da fertilidade devido à diminuição da ovulação (GBOTOLORUN et al., 2008).

## **2.8 Toxicidade do nim em animais e seres humanos**

Efeitos tóxicos do óleo de nim em mamíferos somente ocorrem em doses altas. Já a toxicidade do composto mais estudado presente no óleo de nim, a azadiractina é a seguinte: DL50 oral (para ratos) é de 5000mg/kg de peso corporal, DL50 dermal de 2000mg/kg de peso corporal. Esta toxicidade não é tão baixa quando comparada com o composto natural rotenona, que apresenta DL50 oral de até 1500mg/kg de peso corporal e não apresenta toxicidade dermal. Já em comparação com o composto químico permetrina, que apresenta DL50 oral de até 4000mg/kg e DL50 dermal acima de 4000mg/kg, mostra que o composto químico apresenta toxicidade oral mais baixa (COATS, 1994).

Segundo Srivastava e Raizada (2001), embora a azadiractina tenha baixa toxicidade aguda para espécies mamíferas, com dose letal (DL 50) maior do que 5.000mg/kg em ratos, a possibilidade de riscos não deve ser ignorada.

A ingestão do óleo de nim pode produzir toxicidade letal em tilápias e carpas, toxicidade aguda em ratos e coelhos e severa hipoglicemia em ratos (SCHMUTTERER, 1995; GANDHI et al., 1998; BISWAS et al., 2002). Aproximadamente 60% de mortalidade foi

observada em uma pesquisa onde galinhas Leghorn foram alimentadas por 24 horas com os frutos do nim (SINGH et al., 1985; JACOBSON, 1995).

Em casos isolados, a intoxicação por óleo de nim em seres humanos produz sonolência, diarreia, náusea, vômito, acidose metabólica, anemia, leucocitose por neutrofilia, letargia, coma, edema cerebral e morte (SCHMUTTERER, 1995; BISWAS et al., 2002; NATURAL MEDICINES COMPREHENSIVE DATABASE, 2002).

Numa pesquisa onde se avaliaram 99 prontuários de felinos expostos ao óleo de nim, constatou-se que 88 animais apresentaram sinais clínicos de toxicidade. Os sinais clínicos apresentados pelos felinos foram letargia (12 casos), ataxia (13 casos), sialorréia (11 casos), espasmos (17 casos), tremores (17 casos) e convulsões (32 casos) (SUTTON et al., 2009). Em estudos de toxicidade do óleo de nim em coelhos observou-se que os sinais clínicos apresentados pelos animais foi similar aos apresentados pelos gatos avaliados na pesquisa realizada por Sutton et al. (2009).

Raji et al. (2004) verificaram que a administração intraperitoneal de *Azadirachta indica* (1000mg/kg de extrato) não produziu sinais de toxicidade em ratos, nem alteração significativa no peso corpóreo ou de órgãos durante 3 semanas após aplicação, não sendo observado diarreia, comportamento estereotipado ou morte durante esse período, entretanto, a administração oral na dose de 3200mg/kg do extrato causou 100% de mortalidade.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material Botânico**

A espécie vegetal (*Azadirachta indica* A. Juss) foi obtida em uma propriedade rural localizada no município de Lagoa do Carro, Estado de Pernambuco, de onde foram obtidas as folhas para elaboração do extrato, sendo em seguida identificada pela Engenheira Florestal Dra. Ângela Maria Miranda do Departamento de Engenharia Florestal da UFRPE.

#### **3.2 Obtenção do extrato**

As folhas do nim foram desidratadas em estufa à temperatura de 40° C, durante 72 horas, no laboratório de Patologia Animal da UFRPE. As mesmas foram trituradas manualmente e o pó seco e pulverizado (1,0 kg) foi extraído com etanol (3L) por três vezes. A solução extrativa foi filtrada e evaporada em rotaevaporador a 55° C sob pressão reduzida e obteve-se então, o extrato etanólico bruto 98,18g (rendimento 9,82%) (figura 3).

Foram preparadas “soluções estoque” para serem administradas nos grupos 2, 3 e 4. A solução estoque na concentração de 20mg/mL foi preparada pesando-se 200mg do extrato etanólico do nim, adicionando-se cinco gotas de Cremophor, 1mL de DMSO (Dimetilsulfóxido) a 10% e água destilada até completar o volume de 10mL. A solução estoque para o grupo controle (grupo 1) foi formulada a partir de cinco gotas de Cremophor, 1mL de DMSO a 10% e água destilada para completar o volume de 10mL.



**Figura 3.** Etapas de elaboração do extrato etanólico de nim.

A-Filtração da solução. B-Evaporação do solvente no rotaevaporador. C-Soluções “estoque” do grupo controle e dos grupos experimentais respectivamente.

### 3.3 Procedimentos experimentais

Foram utilizadas 40 ratas Wistar provenientes do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco. As ratas pesavam entre 300 a 400 gramas, foram confinadas em gaiolas de polipropileno, providas de cama de maravalha não esterilizada, alimentadas com ração comercial e água *ad libitum*, temperatura de 22 °C e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes, que estabeleceu o fotoperíodo de 12 horas claro e 12 horas escuro, considerando o período de luz das 6:00 às 18:00 horas.

Os animais foram divididos em quatro grupos compostos por dez animais por grupo, o grupo 1-(grupo controle), grupo 2-tratado com 50mg/Kg, grupo 3-tratado com 100mg/Kg e o grupo 4-tratado com 200mg/Kg do extrato etanólico das folhas de nim.

O sistema de acasalamento foi do tipo poligâmico, no qual ao final da tarde, três fêmeas para cada macho foram postas para o acasalamento. A gestação foi determinada pela presença de espermatozóides nos esfregaços vaginais, realizados na manhã seguinte ao



acasalamento. Os exames colpocitológicos foram realizados com o auxílio de hastes com algodão umedecido em água destilada, as quais foram introduzidas na vagina produzindo-se movimentos rotatórios. O material coletado foi transferido para lâminas histológicas e foram coradas pelo método panótico e observadas em microscópio óptico.

As ratas prenhes foram tratadas nos 4º, 5º e 6º dias de gestação. As ratas do grupo controle foram tratadas com 1mL da solução estoque para o grupo controle e os grupos 2, 3 e 4 tratados nas doses respectivamente de 50, 100 e 200mg/Kg do extrato etanólico das folhas de nim na concentração de 20mg/mL e receberam nesta ordem o volume de 1mL, 2mL e 3mL. As administrações foram pela via oral com o auxílio da sonda uretral nº8, através de sondagem orogástrica.

Após o 9º dia de inseminação quatro animais de cada grupo foram eutanasiados de acordo com as normas do International Guiding Principles For Biomedical Research Involving Animals (CIOMS) – (Genebra, 1985) e todos os procedimentos realizados nesta pesquisa foram de acordo com o “Consensus Recommendations on Effective Institutional Animal Care and Use Committees” – NIH and USDA – publicados pelo Laboratório de Ciência Animal, edição especial, Janeiro de 1987. O protocolo experimental foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A anestesia realizada foi do tipo dissociativa com xilazina a 2% na dose de 1mg/Kg e quetamina a 10% dose de 90mg/Kg administrados pela via intraperitoneal.

Dos animais submetidos à eutanásia, foram coletados os ovários, embriões e fragmentos de útero, e a fixação dos mesmos foi feita em formol tamponado a 10% para a realização de exame histológico. Os ovários e os embriões foram pesados em balança analítica e o útero foi avaliado macroscopicamente quanto à presença de reabsorções. O processamento para avaliação histomorfométrica ocorreu de acordo com as técnicas de rotina para inclusão em blocos de parafina, onde os mesmos foram cortados em micrótomo rotativo com espessura de 4µm e corados pela técnica da Hematoxilina-eosina (LUNA, 1968). Os aspectos histomorfológicos importantes e relevantes foram microfotografados.

Os seis animais restantes dos quatro grupos além da gestação foram tratados do 1º até o 15º dia de lactação com as mesmas doses propostas para cada grupo.

### **3.4 Avaliação clínica de toxicidade materna e das proles**

Uma vez confirmada a gestação, os animais foram pesados diariamente com auxílio de balança analítica, iniciando-se no primeiro dia de gestação até o 21º dia de lactação. Objetivou-se com esta prática avaliar o desenvolvimento gestacional, da lactação, dos neonatos e dos possíveis sinais de toxicidade materna ou neonatal. Consideraram-se como indicativos clínicos de toxicidade: diminuição da ingestão de alimentos, perda de massa corporal, sangramentos vaginais, aborto, diarreia, piloereção, incoordenação motora e morte.

### **3.5 Avaliação de desenvolvimento das proles**

Os neonatos foram pesados do 1º ao 15º dia de vida e avaliados diariamente quanto a sinais clínicos de toxicidade. No 1º e 7º dia de vida foram avaliados em relação ao reflexo postural, onde os filhotes foram colocados em uma superfície plana, em decúbito dorsal. O reflexo foi avaliado em segundos após o reposicionamento do animal com os quatro membros apoiados sobre a superfície plana.

A avaliação do descolamento das orelhas, crescimento piloso, erupção dos dentes, abertura palpebral e ambulação espontânea foram realizadas diariamente através da observação dos filhotes. Os dias em que estes eventos ocorreram foram anotados para comparação de desenvolvimento entre os grupos. No 21º dia de vida dos filhotes foi feita avaliação da ambulação espontânea com a utilização de um quadrado delimitado medindo 30×30cm dividido em nove espaços iguais. Cada filhote foi colocado individualmente no centro do quadrado e o animal foi observado durante um minuto. A invasão de pelo menos três patas num quadrado foi considerada invasão. Este teste teve por objetivo avaliar a função motora dos filhotes.

## **4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O ganho de massa corporal das ratas tratadas nos nove primeiros dias da gestação, a média de massa corporal dos animais em lactação e a massa corporal das proles avaliadas no 1º, 4º e 21º dias de vida foram avaliadas pelo método de análise de variância (ANOVA).

O teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade foi aplicado para avaliar o número e massa absoluta dos embriões e massa absoluta dos ovários direito e esquerdo (REIS, 2003).

O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para analisar o número total de filhotes e o número de filhotes vivos após 14 dias. As médias por tratamento de taxa de sobrevivência de filhotes por rata (número de filhotes vivos/número total de filhotes) e a avaliação do reflexo

postural dos filhotes no 1º e 7º dia de vida também foram avaliadas por este teste com  $p > 0,05$  (REIS, 2003).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Dados das progenitoras durante a gestação e lactação

A administração do extrato etanólico de nim (*Azadirachta indica* A. Juss) durante o 4º, 5º e 6º dia de gestação não alterou o ganho de massa corporal das progenitoras na gestação (Tabela 1). Apesar do grupo 4 ter originariamente, menor massa corporal do que os demais, o ganho de peso das ratas foi semelhante entre os grupos, destacando-se apenas por apresentar menor variabilidade entre os valores individuais. A maior amplitude observada ocorreu no grupo controle, no qual os valores variaram de -14,52g (perda de massa) até ganho de 17,25g.

Tabela 1. Ganho de massa corporal aos nove dias de gestação das ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados aos 4º, 5º e 6º dias de gestação com extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss).

Grupos	Ganho de peso (g)	
	Média/ DV	CV%
Controle	08,30±10,71	129,0
50mg/Kg	12,06±10,19	84,6
100mg/Kg	13,41±08,92	66,6
200mg/Kg	13,96±04,27	30,6

\*Resultados expresso em média ± desvio padrão.

Os ovários retirados após eutanásia dos animais não apresentaram diferenças significativas em relação à massa absoluta nos quatro grupos avaliados (Tabela. 2).

Tabela 2. Média da massa dos ovários das ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados nos 4º, 5º e 6º dias de gestação com extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss).

Grupos	Ovário direito (g)	Ovário esquerdo (g)
Controle	0,05a	0,07a
50mg/Kg	0,06a	0,10a
100mg/Kg	0,06a	0,05a
200mg/Kg	0,07a	0,08a
Média geral	0,06	0,07
Coefficiente de variação	42,95%	55,18%

Não houve efeito dos tratamentos na massa total dos embriões. Quanto ao número de embriões implantados no útero realizou-se a transformação dos dados através de raiz quadrada, não se observando diferenças estatísticas entre os grupos. Também não ocorreu alteração na média da massa absoluta dos embriões (Tabela 3).

Tabela 3. Média da massa corporal dos embriões e raiz quadrada da média do número de implantações de ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados nos 4º, 5º e 6º dias de gestação com extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss).

Grupos	Nº de embriões (g)	Massa corporal dos embriões (g)
Controle	2,65a	0,09a
50mg/Kg	2,62a	0,13a
100mg/Kg	2,22a	0,07a
200mg/Kg	3,07a	0,09a
Média geral	2,64	0,09
Coefficiente de variação	17,51%	44,64%

No que se refere à massa corporal dos animais em lactação avaliados no 1º, 3º, 5º, 9º e 14º dia, não se evidenciou redução significativa massa corporal das ratas tratadas e não tratadas. Na análise de variância (ANOVA) não se observaram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos testados, em todos os períodos de avaliação ( $p > 0,05$ ) (Tabela 4).

Não foram observados sinais clínicos de toxicidade sistêmica ou reprodutiva como: piloereção, perda de peso, diarreia, estereotípias, sangramento vaginal, ataxia, coma ou morte nas progenitoras tratadas nos 4º, 5º e 6º dia de gestação e do 1º ao 15º dia de lactação.

Tabela 4. Média da massa corporal em gramas (g) de ratas lactantes do grupo controle e dos grupos experimentais tratados na gestação e durante 15 dias na lactação nas doses de 50, 100 e 200mg/Kg com extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss).

Grupos	Dias				
	1	3	5	9	14
1	299,63±23,70	284,82±28,12	294,44±14,04	299,27±16,18	297,13±18,02
2	318,35±29,37	310,00±27,36	309,04±28,93	307,96±31,43	310,21±32,48
3	355,19±79,22	317,82±33,75	318,04±30,32	314,75±32,01	311,23±36,32
4	279,51±16,19	284,24±17,87	287,18±13,56	290,13±17,36	290,63±20,75
Total geral	313,17	299,22	302,17	303,03	302,30

\*Resultados expresso em média ± desvio padrão.

## **5.2 Avaliação da morfologia ovariana e uterina das ratas prenhes**

Na análise morfológica dos órgãos reprodutivos (dos ovários e útero), observaram-se morfologia normal em ambos os órgãos. Nos ovários foram observados folículos em desenvolvimento, folículos antrais, corpos lúteos e na região medular, células intersticiais (figura 4). No útero, visualizou-se endométrio com as glândulas endometriais, vasos sanguíneos e morfologia normal em ambas às camadas uterinas (figura 5).

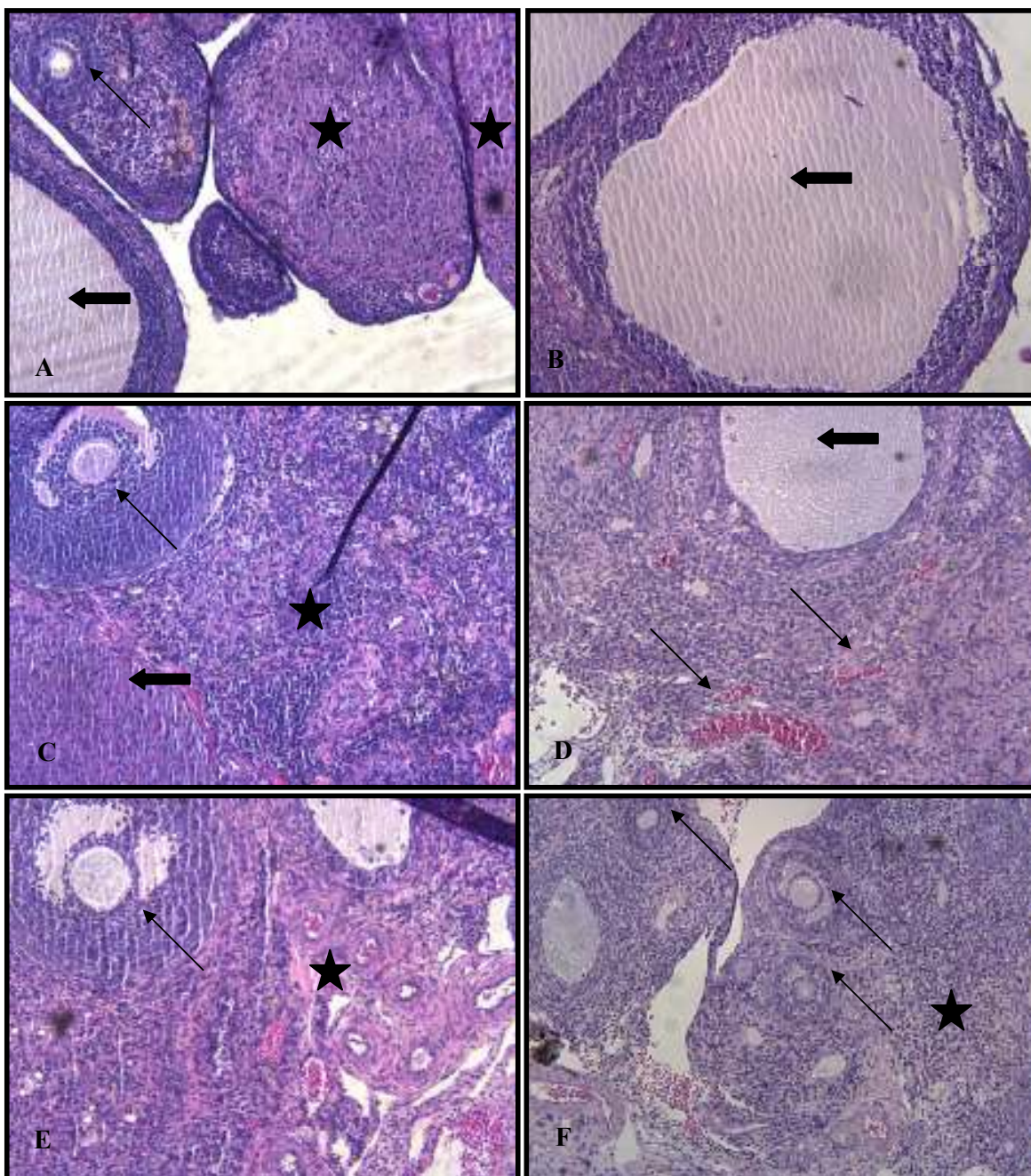


Figura 4-Fotomicrografias de ovários de ratas prenhas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados por via oral com extrato etanólico das folhas de nim entre 4º e 6º dias de gestação. Aumento 10x. HE.

Figura 4A-Rata do grupo 3. Notar folículo em desenvolvimento (seta), dois corpos lúteos (estrelas) e um folículo antral (seta larga). Aumento 10x. HE.

Figura 4B Rata do grupo 1. Constatar presença de folículo antral (seta larga). Aumento 10x. HE.

Figura 4C-Rata do grupo 2. Notar folículo em desenvolvimento (seta), corpo lúteo (seta larga) e região medular com células intersticiais e infiltrado inflamatório (estrela). Aumento 10x. HE.

Figura 4D-Rata do grupo 4. Observar folículo antral (seta larga), vasos congestionados na região medular (setas). Aumento 10x. HE.

Figura 4E-Rata do grupo 2. Notar folículo em desenvolvimento (seta), região medular com presença de artérias e células intersticiais (estrela). Aumento 10x. HE.

Figura 4F-Rata do grupo 4. Constatar folículos em vários estágios de desenvolvimento (setas) e região medular com células intersticiais (estrela). Aumento 10x. HE.

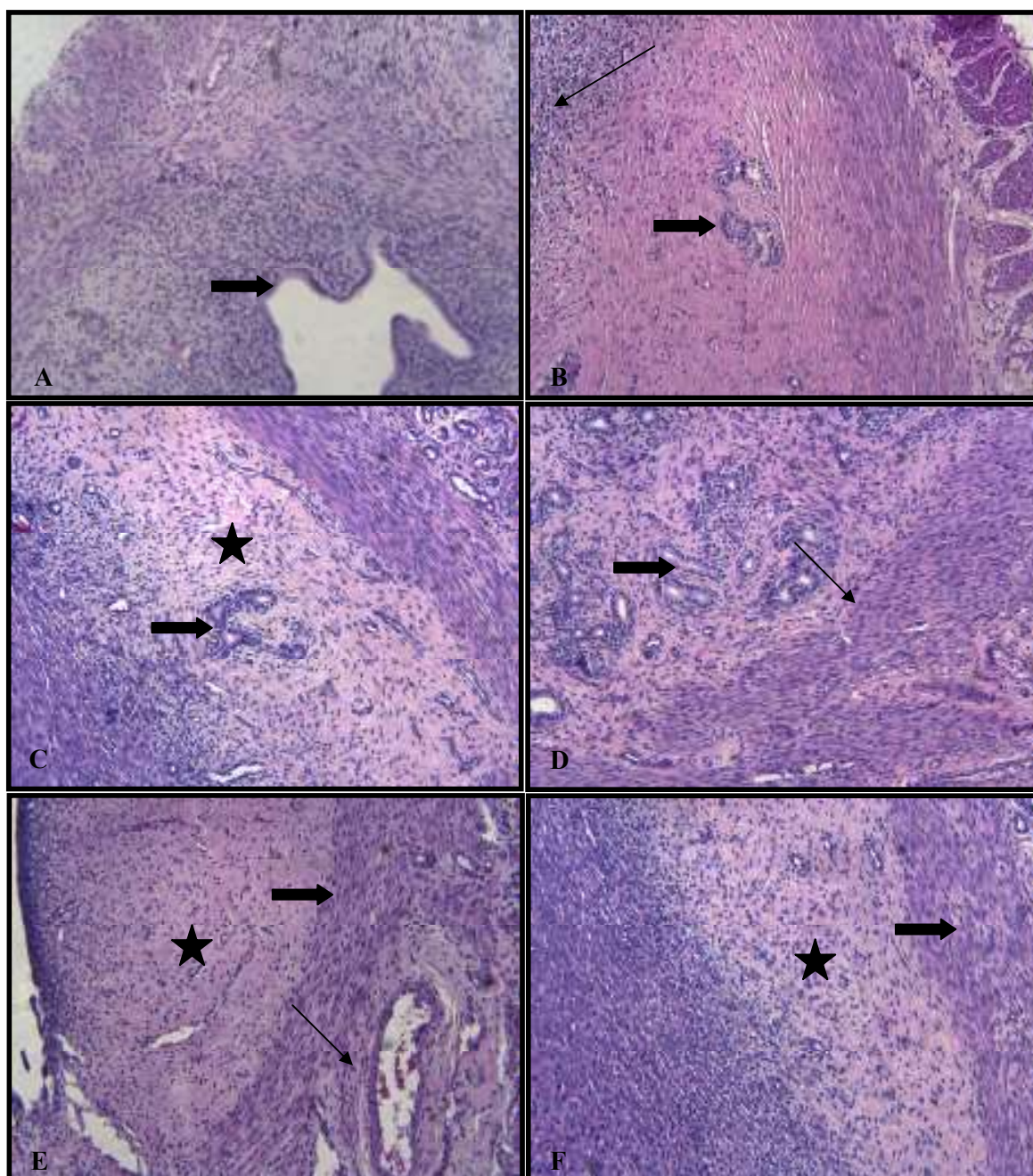


Figura 5-Fotomicrografias de útero de ratas prenhes do grupo controle e dos grupos experimentais tratados por via oral com extrato etanólico das folhas de nim entre 4º e 6º dias de gestação. Aumento 10x. HE.

Figura 5A-Rata do grupo 4. Notar infiltrado inflamatório sub-epitelial (seta larga). Aumento 10x. HE.

Figura 5B-Rata do grupo 1. Observar atrofia das glândulas endometriais com grande quantidade de colágeno (seta larga) e uma área de com infiltrado inflamatório (seta). Aumento 10x. HE.

Figura 5C-Rata do grupo 2. Constatar atrofia de glândulas endometriais (seta larga) e endométrio (estrela). Aumento 10x. HE.

Figura 5D-Rata do grupo 3. Notar atrofia de glândulas endometriais (seta larga) e miométrio (seta). Aumento 10x. HE.

Figura 5E-Rata do grupo 4. Observar endométrio com glândulas endometriais (estrela), miométrio (seta larga) e um vaso sanguíneo (seta). Aumento 10x. HE.

Figura 5F-Rata do grupo 2. Constatar endométrio não-reactivo (estrela) e miométrio (seta larga). Aumento 10x. HE.

### 5.3 Dados do desenvolvimento dos filhotes

Após o nascimento da prole, não foi constatada a presença de natimortos, nem de qualquer má-formação neonatal, através do exame macroscópico externo dos filhotes do grupo controle e dos grupos experimentais.

O desenvolvimento físico dos filhotes de mães do grupo controle e dos grupos experimentais tratados pela via oral com o extrato etanólico de nim durante três dias na gestação e por 15 dias na lactação não alterou o tempo do início do crescimento piloso, erupção de incisivos, descolamento dos pavilhões auriculares, abertura palpebral e andar adulto entre os quatro grupos estudados (Quadro 1).

Quadro 1. Dados do desenvolvimento das proles das ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados nas doses de 50, 100 e 200mg/Kg durante a gestação e por 15 dias na lactação com extrato etanólico da folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss).

Parâmetros avaliados	Grupos
Erupção de incisivos	9º dia em todos os grupos.
Abertura de olhos	14º dia em todos os grupos.
Descolamento dos pavilhões auriculares	4º dia em todos os grupos.
Crescimento piloso	8º dia em todos os grupos.
Andar adulto	15º dia em todos os grupos.

A massa corporal dos filhotes de todos os grupos foi avaliada através de pesagens nos dias 1º, 4º e 21º não se observando diferenças estatísticas (análise de variância) entre os grupos (Tabela 5).

Os filhotes também não apresentaram sinais clínicos de toxicidade sistêmica como: diarreia, sialorréia, tremores, pêlos eriçados, alteração na ambulação, diminuição da massa corporal, coma ou morte.



Tabela 5. Média da massa corporal das proles das ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados na gestação e por 15 dias na lactação com o extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss).

Grupos	Média de massa corporal (g)		
	Dia 1	Dia 4	Dia 21
Controle	6,30a	9,55a	36,10a
50mg/Kg	7,17a	9,78a	42,47a
100mg/Kg	6,57a	7,61a	35,49a
200mg/Kg	6,44a	9,39a	41,84a
Média geral	6,62	9,08	39,02
Coefficiente de variação	13,15%	31,97%	32,55%

O teste de Kruskal-Wallis aplicado ao número total de filhotes e ao número de filhotes vivos após 14 dias, indicou não haver diferença entre os tratamentos testados. As médias por tratamento de taxa de sobrevivência de filhotes por rata (número de filhotes vivos/número total de filhotes) também se mostraram semelhantes pelo mesmo teste ( $p>0,05$ ). A percentagem de sobrevivência de filhotes foi de 79,4% , sendo mais baixa no grupo 3, devido à mortalidade de grande número de filhotes de apenas duas ratas, enquanto as demais do mesmo tratamento apresentaram 100% de sobrevivência. No Grupo 1, o número de filhotes mortos também foi sensivelmente aumentado pelo número de mortes da prole de apenas uma rata. Essas variações casuais, entre animais submetidos ao mesmo tratamento, refletem-se nos resultados dos testes que não apontam efeito significativo dos tratamentos na quantidade de filhotes gerados e na taxa de sobrevivência dos filhotes (Tabela 6).

Tabela 6. Número total e taxa de sobrevivência de filhotes de ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados na gestação e por 15 dias na lactação com o extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss).

Grupo	Número de filhotes			Sobrevivência %
	Mortos	Vivos	Total	
Controle	10	33	43	76,74
50mg/Kg	4	44	48	91,67
100mg/kg	23	34	57	59,65
200mg/Kg	4	47	51	92,16
Total	41	158	199	79,40

Pelo teste de Kruskal-Wallis não se observaram diferenças entre os grupos quanto à avaliação do reflexo postural avaliado nos 1º e 7º dia de vida dos filhotes (tabela 7).

**Tabela 7.** Média de tempo do reflexo postural de filhotes avaliados nos 1º e 7º dia de vida das ratas do grupo controle e dos grupos experimentais tratados na gestação e por 15 dias na lactação com o extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss).

Grupos	Média de tempo do reflexo postural (s)	
	1º dia de vida	7º dia de vida
Controle	70,00a	85,50a
50mg/Kg	107,00a	61,00a
100mg/kg	57,00a	76,00a
200mg/Kg	66,00a	77,50a
Média geral	75,00	75,00

Quanto à atividade locomotora, os resultados obtidos a partir da observação da ambulação, dados por número de quadrados invadidos, foram semelhantes nos quatro grupos, com elevada amplitude intra-grupo, não se evidenciando efeitos dos tratamentos testados (Tabela. 8).

**Tabela 8.** Avaliação da atividade locomotora dos filhotes de mães do grupo controle e dos grupos experimentais tratados na gestação e por 15 dias na lactação com o extrato etanólico das folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss).

Grupos	Número de filhotes observados	Número de quadrados invadidos		
		Média	Mínimo	Máximo
Controle	34	13,7	5	27
50mg/Kg	38	12,3	2	21
100mg/Kg	41	13,6	2	26
200mg/Kg	43	15,4	7	25

## 6. DISCUSSÃO

Conceitualmente, fecundidade é a capacidade para a reprodução, ao passo que fertilidade refere-se à concretização da reprodução e pode ser avaliada pelo produto final, ou seja, o número de novos indivíduos (ALMEIDA et al., 2000). A capacidade reprodutiva de uma fêmea envolve aspectos variados de fisiologia reprodutiva: capacidade de produção de gametas adequados, produção hormonal equilibrada, alterações morfológicas e bioquímicas do oviduto e do útero compatíveis com os processos de transporte de espermatozóides, zigoto, fases precoces e tardias do desenvolvimento do conceito (GUERRA, 2002).

A toxicidade reprodutiva é a ocorrência de qualquer interferência causada por alguma substância nas capacidades reprodutivas de machos e fêmeas, incluindo o período pré-natal e pós-natal (NEUBERT et al., 1992). Este tipo de avaliação além de levar em consideração os parâmetros reprodutivos toma por base os parâmetros clínicos de toxicidade sistêmica, pois um animal debilitado não tem condições de ter a fecundidade e a fertilidade adequadas.

Para avaliação e diagnóstico da toxicidade sistêmica deve-se levar em consideração a diminuição da massa corporal dos animais, do desenvolvimento ponderal, do consumo de água e ração, pelo aparecimento de alterações comportamentais e físicas, como apatia, movimentos estereotipados, prostração, pelos arrepiados, diminuição da massa corporal além de alterações na massa relativa dos órgãos (MANSON e KANG, 1994; CHAHOUD et al., 1999; MELLO, 2001).

Na presente pesquisa não foram observadas alterações no ganho de massa corporal das progenitoras do grupo controle e dos grupos experimentais e os animais não exibiram qualquer sinal clínico de toxicidade sistêmica ou reprodutiva. Estes resultados diferem dos encontrados por Gbotolorun et al. (2008) que encontraram redução de 6,46% na massa corporal de ratas tratadas do 1º ao 5º dia, por via oral, com 1mg/Kg do extrato alcoólico das flores de nim na gestação. Estes animais tiveram diarreia durante o tratamento e houve efeito tóxico do extrato alcoólico das flores do nim. Este mesmo extrato causou diminuição da fertilidade de ratas tratadas na dose de 1000mg/Kg durante 21 dias, devido ao prolongamento da duração do diestro e conseqüentemente diminuição da freqüência do estro. Os resultados obtidos nesta pesquisa se assemelham aos observados por Raizada et al. (2001) que constaram ausência de efeitos adversos à administração de azadiractina a 12% via oral, em ratos machos e fêmeas prenhes com a dose de até 1500mg/kg/dia por um período de 90 dias, não tendo estes autores, verificado sinais farmacotóxicos, teratogênicos, mortalidade, alterações de peso ou alterações dos parâmetros sanguíneos.

Em relação à morfologia ovariana e uterina das ratas submetidas a eutanásia no 9º dia de gestação, os resultados da presente pesquisa demonstraram morfologia normal ovariana e uterina para os animais do grupo controle e também dos grupos experimentais. Esses resultados diferem dos encontrados por Roop (2005) que analisou os aspectos quantitativos do desenvolvimento folicular em ratas albinas na fase reprodutiva. Este autor verificou redução significativa no número normal de folículos bem como nos folículos em vários estágios do desenvolvimento em todos os grupos tratados com extrato metanólico e hexânico de sementes de *A. indica* nas doses de 3 e 6mg/kg de peso vivo e *M. azedarach* (cinamomo) na dose de 24mg/kg.

Owolabi (2008) investigou os efeitos da administração oral do extrato metanólico das folhas de nim; avaliou a morfologia ovariana de ratas wistar tratadas com 200 e 400mg por 14 dias e mensurou os níveis séricos do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), não tendo observado alterações histopatológicas ovarianas, nem diferenças estatísticas significativas nos níveis de FSH entre os grupos tratados. Contudo, este autor observou redução nos níveis de LH o que comprometeu a produção e liberação dos oócitos durante o período ovulatório e conseqüentemente também diminuiu a fertilidade das fêmeas. Estes resultados, referentes à fertilidade e a avaliação histológica dos ovários desses animais, divergem dos encontrados no presente trabalho.

As condições hormonais maternas são necessárias para o bom desenvolvimento embrionário, sendo amplamente conhecido que níveis sanguíneos de progesterona inadequados interferem com a viabilidade do embrião, por não permitirem que o endométrio esteja adequadamente preparado para a sustentação da gestação. Através do peso do ovário e do número de corpos lúteos de gestação pode-se deduzir, indiretamente, as condições hormonais relativas a progesterona materna. A massa absoluta do ovário depende bastante do número e do volume dos corpos lúteos, visto serem eles as maiores estruturas no ovário. Os corpos lúteos são os principais responsáveis pela secreção de progesterona (KATO et al., 1979); eles aumentam de volume durante a gestação, tendo sido demonstrado que seu crescimento está intimamente correlacionado com o aumento de secreção de progesterona e 20-hidroxi-progesterona (UCHIDA et al., 1970), hormônios também indispensáveis à manutenção da prenhez na rata. Qualquer alteração que diminua os níveis de progesterona ou que comprometa o desenvolvimento embrionário pode provocar a interrupção da gestação.

Alterações no desenvolvimento do pré-embrião podem ocorrer devido à lesão direta ou indireta de um agente tóxico. No primeiro caso, a lesão é direta sobre o concepto, e no segundo, pode decorrer de modificação do tempo de transporte até o útero, prejudicando a

sincronia necessária da fase do desenvolvimento embrionário, assim como a preparação do endométrio, necessária para a implantação (ROBLERO, 1987). Neste contexto, e com base nos resultados obtidos, pode-se sugerir que o extrato etanólico de nim não causa lesão direta ou indireta sobre o embrião, evidenciada pela avaliação macroscópica uterina expressa pela ausência de reabsorções e pela presença de embriões implantados.

A média de implantações embrionárias no grupo 4 foi de 9,42, sendo este o maior número de implantações, enquanto que no grupo 3 a média foi de 5 implantações. A média geral foi de 7 implantações. Estes resultados diferem dos resultados encontrados numa pesquisa em que o óleo de nim foi aplicado via corno uterino e observou-se ausência de implantações e presença de reabsorções, e em contrapartida, o corno uterino utilizado como controle foi tratado com óleo de amendoim e apresentou média de 4 a 6 implantações embrionárias (UPADHYAY et al., 1990).

Um parâmetro bastante utilizado para avaliação de toxicidade nos animais é a avaliação da massa corporal (MANSON e KANG, 1994; CHAHOUD et al., 1999; MELLO, 2001). No que se refere à massa corporal dos filhotes das progenitoras tratadas durante a gestação e lactação com o extrato do nim avaliadas no 1º, 4º e 21º dia de vida, observou-se semelhança com os resultados obtidos por Raizada e Srivastava (2007). O desenvolvimento físico dos filhotes (abertura palpebral, descolamento das orelhas, crescimento piloso, ambulação espontânea e erupção de incisivos) foram semelhantes aos resultados encontrados na pesquisa realizada por Costa-Silva et al. (2006).

Na presente pesquisa, os dados referentes à porcentagem de sobrevivência de filhotes foram de 79,4% no grupo 1, sendo mais baixa no grupo 3 (59,65%), devido à mortalidade de grande número de filhotes de apenas duas ratas, enquanto as demais do mesmo tratamento apresentaram 100% de sobrevivência. No grupo 1, o número de filhotes mortos também foi sensivelmente influenciado pelo número de mortes da prole de apenas uma rata. Essas variações provavelmente ocorreram, devido ao comportamento e às condições individuais destes animais dentro de cada grupo.

O comportamento materno em mamíferos é definido por todo o cuidado dado pelas mães aos seus filhotes, desde o nascimento, até que eles desenvolvam características e habilidades que assegurem sua própria sobrevivência, tornando-se independentes da dieta láctea e dos demais cuidados maternos (CROWELL-DAVIS e HOUP, 1986). O comportamento e o aleitamento materno são imprescindíveis para a manutenção da espécie. As ratas do grupo 3 e do grupo 1 tiveram comportamento materno inadequado para com suas proles. Isto ficou bem claro na observação diária destes animais, e também pela análise de

sobrevivência, observando-se que as mesmas não amamentaram adequadamente e não deram o suporte necessário para suas crias. Isso explica o elevado número de mortes neonatais dessas ratas.

O desenvolvimento da atividade motora dos filhotes pode ser avaliado pelo reflexo postural e neste aspecto as proles das ratas do grupo 3 obtiveram a menor média do reflexo postural avaliado no 1º dia, com média de 57 segundos, enquanto que os filhotes das progenitoras do grupo 2 obtiveram a maior média, 107 segundos. Na avaliação do 7º dia o grupo 2 apresentou a menor média (61 segundos), e os filhotes do grupo 1 apresentaram a maior média (85,5 segundos). Estes dados demonstram que no 1º dia os filhotes do grupo 3 foram mais ágeis, em contrapartida, o grupo 1 apresentou retardo no reflexo ao 7º dia.

Apesar das diferenças, estas não foram estatisticamente significativas. Esses dados sugerem que o extrato de nim causou retardo na atividade do sistema nervoso de maneira geral nos filhotes dos quatro grupos e estes resultados são semelhantes aos de Jaiswal et al. (1994), entretanto diferem dos resultados obtidos por Costa-Silva et al. (2006) que avaliaram o reflexo postural em filhotes de ratas tratadas com o óleo de andiroba, que também é uma meliácea como o nim, e os animais tratados com a menor dose (0,375g/Kg), obtiveram o maior tempo para responder aos reflexos no 1º dia, enquanto que o grupo controle foi o mais rápido e demorou média 14 segundos para resposta ao reflexo. Em todos os grupos avaliados no 7º dia, observou-se médias inferiores aos encontradas nesta pesquisa, destacando-se os neonatos das ratas do grupo tratado com a dose de 1,5g/Kg, apresentando média de 2,1 segundos para resposta ao reflexo.

No 21º dia de vida foi realizada avaliação da atividade motora dos filhotes e a ambulação espontânea (invasão de quadrados) que teve por objetivo avaliar o desenvolvimento do sistema nervoso dos animais. A média de quadrados invadidos pelos filhotes do grupo 2, foi de 12,3, enquanto que a maior média foi do grupo 4 que obteve a média de 15,4 quadrados. Esses resultados diferem dos encontrados por Costa-Silva et al. (2006) que avaliaram a atividade motora de filhotes de ratos no 21º dia de vida de progenitoras tratadas do 1º ao 21º dia de gestação em diferentes doses com o óleo de andiroba. Os animais tratados com a menor dose (0,375g/Kg) obtiveram a maior média, que foi de 24,1 quadrados invadidos, enquanto que os animais do grupo controle obtiveram média de 15,1 quadrados invadidos. Os resultados deste trabalho sugeriram que o óleo da andiroba exerce uma ação central e está refletida no aumento da atividade motora dos filhotes.

Os resultados obtidos no presente trabalho refletiram um discreto retardo na atividade motora e na ambulação espontânea, entretanto sem repercussões clínicas ou do

desenvolvimento neonatal, assemelhando-se aos resultados observados por Jaiswal et al. (1994) que notaram efeito ansiolítico semelhante ao diazepam, com o extrato das folhas de nim em baixas doses (10-200mg/Kg). Por outro lado, esses resultados são antagônicos aos resultados obtidos por Raizada e Srivastava (2001) que pesquisando o efeito da administração da azadiractina a 12% em ratas durante o 6º ao 15º dia de gestação, constataram que os animais apresentaram hiperatividade durante o tratamento, porém sem sinais de toxicidade.

No presente experimento, as ratas gestantes, lactantes e as suas proles não apresentaram sinais clínicos compatíveis com toxicidade sistêmica, diferentemente dos resultados encontrados por Tandam et al. (1995) e Sutton et al. (2009) que observaram toxicidade sistêmica em coelhos e em felinos expostos ao óleo de nim respectivamente.

## **7. CONCLUSÃO**

A administração do extrato etanólico das folhas de nim não causou toxicidade reprodutiva ou sistêmica nos animais, não induziu teratogenicidade, não alterou o desenvolvimento físico e do sistema nervoso das proles. Portanto, o extrato testado nas dosagens de 50, 100 e 200mg/Kg pode ser considerado como seguro para utilização no período pré e pós-natal em ratas.

## 8. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, P. A.; ZORN, T. M. T. Implantation and decidualization in rodents. **Journal of Experimental Zoology**, v. 266, p. 603-628, 1993.

AHMED, N.U.; MOSTAFA, M.; AWAL, M.A.; ALAM, M.N. Comparative efficacy of modern anthelmintics with that of neem seeds against gastrointestinal nematodiasis in sheep. Apud CHAGAS, A.C.S. Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, suplemento 1, p. 156-160, 2004.

BADAM, L.; JOSHI, S.P.; BEDEKAR S.S. *In vitro* antiviral activity of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract against group B coxsackieviruses. **Journal Community Dis**, v. 31, p. 79–90, 1999.

BALASENTHIL, S.; ARIVAZHAGAN, S.; RAMACHANDRAN, C.R.; RAMACHANDRAN, V.; NAGINI, S. **Journal Ethnopharmacology**, v 67, p.189-95, 1999.

BANDYOPADHYAY, U.; BISWAS, K.; CHATTERJEE, R et al. Gastroprotective effect of neem (*Azadirachta indica*) bark extract: possible involvement of H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase inhibition and scavenging of hydroxyl radical. **Life Sciences**, v.71, p. 2845–2865, 2002.

BANERJEE, R. K.; BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, v. 82, n.11, 2002.

BANY, B. M.; HARVEY, M. B.; SCHULTZ, G. A. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in the mouse uterus during implantation and oil-induced decidualization. **Reproduction**, v.120, p.125 - 134, 2000.

BARROS, S.B.M.; SOLANGE, C.D. Avaliação da toxicidade. In: SEIZE, O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu editora São Paulo LTDA, p.59-70, 1996.



BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA H.S.; GÓRNIK, S.L. BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.566-574, 1999.

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R. K.; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). **Current Science**, v. 82, n. 11, p.10, 2002.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. ANVISA. Portaria 116, de 08 de agosto de 1996. Diário Oficial da União, 12.08.1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução-RE nº 90 de 16 de março de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 16 de março de 2004 (a).

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução-RE nº 48 de 16 de março de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 16 de março de 2004. Seção 1 (b).

CHAHOU, I.; LIGENSA, A.; DIETZEL, L.; FAQI, A.S. Correlation between maternal toxicity and embryo/fetal effects. **Reproductive Toxicology**, v. 13, p. 375-381, 1999.

CHATTOPADHYAY, R.R. Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract: part II. **Journal Ethnopharmacology**, v. 89, p. 217-219, 2003.

COATS, J.R. Risks from natural versus synthetic insecticides. **Annual Review Entomology**. v. 39, p. 489-515, 1994.

COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M.M.A.; LIMA, C. R.; ARRUDA, V.M.; ARAÚJO, A.V. ; RIBEIRO, A.R; ARRUDA, A. C.; FRAGA, M.C.C.A.; LAFAYETTE, S. S.L.; WANDERLEY, A.G. Estudo toxicológico reprodutivo da *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) em ratas wistar. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.25 n.3, p. 425-428, 2006.

CROWELL-DAVIS, S. L.; HOUP, K. A. Maternal Behavior. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.2, n.3, p. 557-571, 1986.

DE FEO, V. J. Decidualization, In: **Cellular Biology of the Uterus**. R. M. Ed, Amsterdam, North Holland, p.192 - 291, 1967.

EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais). Nim: Alternativa no controle de pragas e doenças. **Boletim técnico**, v. 67, p. 25, 2002.

FARRAR, J. D.; CARSON, D. D. Differential temporal and spatial expression of mRNA encoding extracellular matrix components in decidua during the peri-implantation period. **Biology of Reproduction**, v. 46, p.1095 - 1108, 1992.

FILHO, N.F.; FECHIO, D.L.; WENCESLAU, C.V.; FILHO, A.C.R.; LOURENÇO,M.L.G. Mecanismo de ação da Azadiractina do Nim (*Azadirachta indica*) sobre os insetos. Internet:[http://www.unifeob.edu.br/novo/cursos/veterinaria/anexos/MODELO\\_Pesq\\_BIBLIO G.doc](http://www.unifeob.edu.br/novo/cursos/veterinaria/anexos/MODELO_Pesq_BIBLIO_G.doc). Acessado em 08/01/2008.

FINN, C. A. The biology of decidual cells. **Advacend Reproductive Physiology**, v.5, p.1-26, 1971.

FINN, C. A. The implantation reaction. In: **Biology of the Uterus**. R.M.Wynn, ed.Plenum Press, New York, p. 245 - 308, 1977.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L. Herbal Medicine Today: Clinical and Research Issues. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 4, n.1, p. 37–40, 2007.

GALLO, M.; KOREN, G. Can herbal products be used safely during pregnancy. Focus on Echinacea. **Canadian Family Physician**, v. 47, p.1727-8, 2001.

GANDHI, M.; LAL, R.; SANKARANARAYANAN, A, et al. Acute toxicity study of the oil from *Azadirachta indica* seed (neem oil). **Journal Ethnopharmacology**, v. 23, p.39–51,1998.

GARCIA, J. L. M. O nim indiano: o bioprotetor natural. Série Agricultura Alternativa. Junho. 2000. Disponível em: <<http://www.agrisustentavel.com/doc/nim.htm>>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2009.

GARG, S. DONCEL, G. CHABRA, S. UPADHYAY, S. N. TALWAR G.P. Synergistic spermicidal activity of neem seed, saponins and quinine hydrochloride. **Contraception**, v.50, P.185- 190, 1994.

GBOTOLORUN, S.C.; OSINUBI, A.A.; NORONHA, C.C.; OKANLAWON, A.O. Antifertility potential of neem flower extract on adult female Sprague-dawley rats. **African Health Sciences**, v.8, n.3, september, 2008.

GENEBRA 1985. **Princípios internacionais para pesquisa biomédica envolvendo animais**. Adaptado do International Guiding Principles For Medical Research Involving Animals (CIOMS). Internet. Acessado em 17/01/2008.

GUERRA, M. O.; SOUZA, E. R.; PETERS, V. M. Capacidade preliminar do efeito interceptivo do lapachol em ratas wistar. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.48, p. 135-139, 2002.

HANSEN, W.F.; YANKIWITZ, J. Pharmacologic therapy for medical disorders during pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v.45, n.1, p.136-152, 2002.

HOWATT, K. **Azadirachta indica: one tree's arsenal Against Pests**. Colorado State University, Fort Collins, Colorado 80523, 1994.

HURST, P. K.; PALMAY, R. D. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors during the implantation period in the rat uterus. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 11, p. 395-402, 1999.

IWAHASHI, M.; MURAGAKI, Y.; OOSHIMA, A. et al. Alterations in distribution and composition of the extracellular matrix during decidualization of the human endometrium. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.108, p.147-155, 1996.

JACOBSON, M. The Neem Tree: Source of Unique Natural Products for Integrated Pest Management, Medicine, Industry and Other Purposes (ed. Schmutterer, H.), p. 484-495, 1995.

JAISSWAL, A.K.; BHATTACHARYA, S.K.; ACHARYA, S.B. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.32, p.489-491, 1994.

JUNEJA, S. C.; PFEIFER T.; WILLIAMS, R.S. CHEGINI, N.; Neem oil inhibits the 2-cell embryo development, trophoctoderm attachment and proliferation in vitro. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 11, p.419-427, 1994.

JUNEJA, S. C.; WILLIAMS, R.S.; FAROOQ, A.; CHEGINI, N. Animal Experimentation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.13, n.7, 1996.

KATO H, MORISHIGE WK, ROTCHILD I. A quantitative relationship between the experimentally determined number of conceptuses and corpus luteum activity in pregnant rat. **Endocrinology**, v. 105, p. 846-850, 1979.

KASTURI, M.; AHAMED, R.N.; PATHAN, K.M.; MANIVANNAN, B.; ALADAKATTI, R.H. Ultrastructural changes induced by leaves of *Azadirachta indica* (Neem) in the testis of albino rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v.13, p. 311-328, 2002.

KAZMI, S.A.R.; QADRI, N.M.; BADAR, Y. Mammalian toxicity studies of Nimbokil-60 EC. **Pakistan Journal of Science and Industrial Resources**. v. 44, p. 234-238, 2001.

KHOSLA, P.; BHANWRA, S.; SINGH, J.; SETH, S.; SRIVASTAVA, RK. A study of hypoglycaemic effects of *Azadirachta indica* (Neem) in normal and alloxan diabetic rabbits. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 44, p.69-74, 2000.

LAL, R.; SANKARANARAYANAN, A.; MATHUR, V. S.; SHARMA, P. L. Antifertility effects of neem oil in female albino rats by the intra vaginal and oral routes. **Indian Journal of Medical research**, v.83, p. 89-92, 1986.

LARINI, L. **Compostos ansiolíticos**. In: \_\_\_\_\_, Toxicologia. 3ed. São Paulo. Manole, p.255-265, 1997.

LO, W.Y.; FRIEDMAN, M. Teratogenicity of recently induced medications in human pregnancy. **Obstetrics e Gynecology**, v.100, n.3, p.464-473, sept, 2002.

LUNA, L.G. **Manual of histological staining methods of the armed force institute of pathology**. 3.ed. New York: Mc Graw-Hill, p.258, 1968.

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.

MANSON, J.M.; KANG, Y.J. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: Hayes AW **Principles and methods of toxicology**. 3.ed. New York: Raven Press. Cap.28, p. 989-1037, 1994.

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

MARTINEZ, S. S.; O *Nim-Azadirachta indica*-um Inseticida Natural. 2006. [online]. Disponível em: <http://200.201.27.14/noticias/novonim.html>. Acesso em: 4 de janeiro 2009.

MARTINEZ, S.S.; VAN ENDEM, H.F. Growth disruption, abnormalities and mortality of *Spodoptera littoralis* caused by azadirachtin. **Neotropical Entomology**, v.30, n.1, p.113-125, 2001.

MELLO, F.B. **Estudo dos efeitos de *Lantana camara* (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. 120f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.

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

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

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

Natural Medicines Comprehensive database, Stockton (CA): **Therapeutic Research Faculty**; p. 914-915, 2002.

NEUBERT, D.; KAVLOCK, R.J.; MERKER, H.J.; KLEIN, J. Risk assessment of prenatally-induced adverse health effects. Berlin: Springer Verlag, p.565, 1992.

NEUBERT, D.; MERKER, H.J. KWASIGROCH, T.E. Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, p. 474, 1977.

OSWEILER, G.D. **Toxicologia veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, p.526, 1998.

OWOLABI, L.L.; GBOTOLORUN, S. C, AKPANTAH, A.O, EKONG, M.O, ELUWA, M.A, EKANEM, T.B. **Nigerian Quarterly Journal of Hospital Medicine**, v.18, n.4, p.194-7, 2008.

PERALTA, O. Influencia de un anticoncepcional oral combinado sobre la lactancia y el crecimiento del niño. Ver. **Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología**, n.5, v.68, p.372-80, 1983.

PERPÉTUA, P. C.G.; LIBERATI, M.N.; SIMONELLI, S. M.; LEONARDO, J. M. L.O. Eficácia do óleo de nim (*Azadirachta indica*) no controle do carrapato do cão (*Rhipicephalus sanguineus*). **Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar**, 27 a 30 de outubro de 2009.

PESSOA, L. M. **Atividade ovicida in vitro de plantas medicinais contra *Haemonchus contortus***. Fortaleza, 2001. 68f. (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Ceará).

RAIZADA, R.B.; SRIVASTAVA, M.K.; KAUSHAL, R.A.; SINGH, R.P. Azadiractin, a neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, p. 477-83, 2001.

RAIZADA, R.B.; SRIVASTAVA, M.K. Lack of toxic effect of technical azadiractin during postnatal development of rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p. 465-471, 2007.

RAJI, Y.; OGUNWANDE, I.A.; OSADEBE, C.A.; JOHN, G. **Journal. Ethnopharmacology**, v. 90, p. 167-170, 2004.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n.2, p, 56-69, 2001.

RAY, A.; BANERJEE, B.D.; SEN, P. 1996. Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by Azadirachta indica (Neem) in mice. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 34, p.698-701, 1996.

REIS, J. C. **Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária**. Olinda, 2003, 651p.

RIAR, S. S; DEVKUMAR, C.; ILAVAZHAGAN, G.; BARDHAN, J.; KAIN A. K.; THOMAS, P. Volatile fraction of neem oil as spermicide. **Contraception**, v. 42, n. 4, p.479-87, 1990.

RIAR, S.; BARDHAN, J.; THOMAS, P.; KAIN, A. K.; RAJENDRA, P. M. Mechanism of antifertility action of neem oil. **Indian Journal of Medical Research**, v. 88, p. 339-342, 1988.

ROBLERO L. S.; FERNANDEZ O.; CROXATTO H. B. The effect of RU486 on transport, development and implantation of mouse embryos. **Contraception**, v. 36, n. 5, p.549-555, 1987.

ROMAGNANO, L.; BABIARZ, B. The role of murine cell surface alactosyl transferase in trophoblast: laminin interactions in vitro. **Developmental Biology**, v.141, p.254 - 261, 1990.

ROOP, J.K.; DHALIWA, P. K. GURAYA, S. S. Extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* seeds inhibit folliculogenesis in albino rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, n.6, p.943-947, 2005.

SAMPATHRAJ, R., NARAYANAN, P.B.S., VANITHAKUMARI, C. Effect of Neem Oil: Structural and Functional Changes in the Epididymis of Rats. **World Neem Conference**, India, p. 1173–1181, 1993.

SANTOS, L.U.; ANDRADE, C.F.S. *Azadirachta indica* - A Árvore do Nim e o Controle de Piolhos. Março, 2000. Internet:<http://www.piolho.org.br/artigos/arvoredonim.pdf>. Acessado em 09/01/2008.

SAXENA, R.C. Insecticides from Neem. In: ARNASON, J.T.; PHILOGENE, B.J.R.; MORAND, P. (Ed.) *Insecticides of plantorigin*. Washington: ACS, cap.9, p.110-129,1989.

SCHARDEIN, J.L. Principles of teratogenesis applicable to drug and chemical exposure. In: *Chemically Induced Birth Defects* (Schardein, J.L ed) 3<sup>rd</sup> Rev e ex Marcel Dekker Inc, New York, p. 1-67. 2000.

SCHMUTTERER, H. Insect growth-disrupting and fecundityreducing ingredients from the neem and chynaberry trees. In: MORGAN, E.D.; MANDAVA, N.B. **CRC Handbook of natural pesticides: insect growth regulators; Part B**. Boca Raton: CRC Press.. v.3, p.119-167, 1987.

SCHMUTTERER, H. The neem tree: source of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry, and other purposes. New York: VCH Publishers Inc; p. 1-366, 518–54, 484-95, 1995.

SHARAPIN N. Medicinal plants: pharmacopoeial prescriptions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.71 p. 295-298, 1999.



SHARKEY, M. E.; ADLER, R. R.; NIEDER, G. L. and BRENNER, C. A. Matrix metalloproteinase expression during mouse peri-implantation development. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 36, p.72 - 80, 1996.

SINGH N.; SASTRY M.S; Anti-microbial activity of neem oil. **Indian Pharmaceutical**, v. 13, p.102, 1981.

SINGH, Y. P.; BAHGA, H. S.; VIJJAN, V. K. **Neem News**, v.2, p.17, 1985.

SINHA, K. C.; RIAR, S. S.; BARDHAN, J.; THOMAS, P.; KAIN, A. K.; JAIN, R. K. Antiimplantation effect of neem oil. **Indian Journal of Medical Research**, v.80, p.708-710, 1984.

SINHA, K. C.; RIAR, S. S.; TIWARY, R.S. DHAWAN, A.K; BARDHAN, J.; THOMAS, P.; KAIN, A. K.; JAIN, R. K. Neem oil a vaginal contraceptive **Indian Journal Of Medical Research**, v.79, p. 131-136, 1994.

SONAGLIO D. **Padronização do extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyroclines saturcoides* (LAM) D. C.Compositae (Marcela)**. 163f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêutica) - Curso de Pós-graduação em Ciência Farmacêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1987.

SPENCER, F.; CHI, L.; ZHU, M. X. Time-dependent relationship between the estrogen receptors and the matrix metalloproteinases following deciduoma induction in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part. C, v.120, p. 283 - 288, 1998.

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

SUTTON, M.M.; BATES, N.; CAMPBELL. Apparent adverse reactions to neem (margosa) oil in cats. **Veterinary Record**, v.164, p.592-593, 2009.

TANDAN, S.K.; GUPTA, S.; CHANDRA, S.; LAI, J.; SINGH, R. Safety evaluation of *Azadirachta indica* seed oil, a herbal wound dressing agent. **Fitoterapia**, v.66, p.69-72, 1995.

TUCKER, H. A. Lactation and its hormonal control. In KNOBIL e NEILL, J. D. eds **The physiology of reproduction**. New York, Raven Press, v.2, p.1065-98,1994.

UCHIDA, K.; KADOWARI, M.; NOMURA, Y.; MIYATA, K.; MIYAK, T. Relationship between ovarian progesterin secretion and corpora lutea function in pregnant rat. **Endocrinology Japan**, v.17 p.499-507, 1970.

UPADHYAY, S. N.; DHAWAN, S. GARG, S.; TALWAR, G.P. Immunomodulatory effects of neem (*Azadirachta indica*) oil. **Immunopharmacology**, v.14, p.1187, 1992.

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

WARTHEN Jr, J.D. Neem (*Azadirachta indica* A.Juss): organisms affected and reference list update. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v.91, p. 367-388, 1989.

WEIER, K.M.; BEAL, M. Complementary therapies as adjuncts in the treatment of postpartum depression. **Journal of Midwifery & Womens Health**, v. 49, n.2, p.96-104, 2004.

WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. Collaborative study team on the role of Breastfeeding on the prevention of infant mortality. Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious disease in less developed countries: a pooled analysis. **Lancet**, Boston, v. 355, p. 451-455, 2000.