UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Efeitos dos frutos da *Solanum lycocarpum* St Hil em ratas
prenhes e sua prole durante a gestação e início da
lactação: alterações na esfera reprodutiva e na atividade
dos sistemas monoaminérgicos centrais**

Aline Schwarz

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Helenice
de Souza Spinosa

São Paulo
2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Efeitos dos frutos da *Solanum lycocarpum* St Hil em ratas
prenhes e sua prole durante a gestação e início da
lactação: alterações na esfera reprodutiva e na atividade
dos sistemas monoaminérgicos centrais**

Aline Schwarz

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Helenice
de Souza Spinosa

São Paulo
2005

Aline Schwarz

Efeitos dos frutos da *Solanum lycocarpum* St Hil em ratas prenhes e sua prole durante a gestação e início da lactação: alterações na esfera reprodutiva e na atividade dos sistemas monoaminérgicos centrais

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Helenice de Souza Spinosa
orientador/presidente

Viviane Mayumi Maruo
1º. examinador

Ana Cristina Tasaka
2º. examinador

Ernani Pinto Junior
3º. examinador

Regina Lucia Moraes Moreaux
4º. examinador

São Paulo, 11 de novembro de 2005.

Dedico esta tese aos meus queridos pais,
amado filho e irmãos. Sem vocês não
seria o que sou hoje, nem tão pouco
chegaria até aqui. Amo vocês!

"Tenha sempre presente que a pele se enruga, o cabelo embranquece, os dias convertem-se em anos... Mas o que é importante não muda; a tua força e convicção não têm idade. Atrás de cada linha de chegada, há uma de partida. Atrás de cada conquista, vem um novo desafio. Enquanto estiveres vivo, sente-te vivo. Se sentes saudades do que fazias, volta a fazê-lo. Continua, quando todos esperam que desistas. Não deixes que enferruje o ferro que existe em ti. Faz com que em vez de pena, te tenham respeito. Quando não conseguires correr através dos anos, trota. Quando não conseguires trotar, caminha. Quando não conseguires caminhar, use uma bengala. Mas nunca te detenhas!"

Madre Teresa de Calcutá

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a Deus e à Nossa Senhora por me concederem saúde, forças, determinação, vontade e perseverança.

Agradeço aos animais aqui empregados que tiveram suas vidas sacrificadas, pois sem eles nenhum procedimento poderia ter sido desenvolvido. São de fato a alma do trabalho!

Agradeço ao meu querido Nelson que sempre me apoiou, acreditou e me proporcionou momentos de alegria e tranquilidade. Amo você!

Agradeço à Profa. Helenice de Souza Spinosa que me acolheu, confiou e acima de tudo sempre acreditou em mim. Obrigada Professora! O que me tornei hoje devo à senhora!

Agradeço à Profa. Silvia Berlanga pela atenção, apoio e interesse por meu bem estar pessoal e por minha vida profissional. Muito obrigada pela valiosa e importantíssima ajuda! Agradeço de coração!

Agradeço à Dra. Mitsue Haraguchi pela atenção em etapas importantes do projeto.

Agradeço ao Professor Ernani Pinto pela preciosa colaboração. Valeu!

Agradeço aos professores Regina Lúcia Moraes Moreau, Alexandre Barbuto, Wilma Kempinas, Maria Lúcia Z. Dagli, Jorge C. Florio e Maria M. Bernardi pelo valioso auxílio quando necessário. Muito obrigada!

Agradeço à Profa. Dra. Elfriede Marianne Bacchi do Departamento de Farmacognosia da FCF-USP por disponibilizar a estufa para a secagem dos frutos. Muito obrigada!

Agradeço ao Paulo Cesar e à Ester do CEPTOX (USP-Pirassununga) pela valiosa ajuda e amizade. Muitíssimo obrigada!

Agradeço aos meus queridos amigos da Toxicologia: Maurício, Dani, Paula, Simone, Emerson, Luciane, Thiago, Virgínia, Alexandre. Obrigada a todos vocês!

Agradeço aos meus queridos amigos da Veterinária: Milena, Érika, Márcia, Camila, Julia, Andréia, Caio, Guto, Domenica, Monica, Breno, Marcos. Valeu pelo apoio!

Agradeço aos queridos amigos do ICB: Paula, Alexandra, Clara, Andrea, Marisa, Marcio. Conhecer vocês foi tudo de bom!

Agradeço à querida Célia pela valiosa orientação. Muito obrigada!

Agradeço à Magali, Pricila e Ricardo do laboratório do VPT. Obrigada pela atenção!

Agradeço à Cláudia e aos funcionários do biotério do VPT. Obrigada pelo carinho e imprescindível ajuda!

À todos os demais que participaram e colaboraram de alguma maneira nesta etapa que aqui finaliza. Muito obrigada!

Sumário

<i>Lista de Figuras.....</i>	<i>01</i>
<i>Lista de Tabelas.....</i>	<i>04</i>
<i>Resumo.....</i>	<i>07</i>
<i>Abstract.....</i>	<i>08</i>
<i>1. Introdução.....</i>	<i>09</i>
<i>2. Objetivos.....</i>	<i>31</i>
<i>3. Material e métodos.....</i>	<i>32</i>
<i>3.1 Animais.....</i>	<i>32</i>
<i>3.2 Planta.....</i>	<i>32</i>
<i>3.3 Equipamentos, vidrarias, aparelhos e outros.....</i>	<i>33</i>
<i>3.4 Drogas e reagentes.....</i>	<i>35</i>
<i>3.5 Kits analíticos.....</i>	<i>37</i>
<i>4. Procedimentos.....</i>	<i>39</i>
<i>4.1 Extração dos alcalóides dos frutos verdes dessecados e moídos da</i> <i>S. lycocarpum.....</i>	<i>39</i>
<i>4.2 Identificação dos alcalóides solamargina e solasonina nos frutos</i>	

<i>verdes dessecados e moídos da S. lycocarpum.....</i>	<i>42</i>
<i>4.3 Preparo da ração com 10% de S. lycocarpum.....</i>	<i>44</i>
<i>4.4 Diagnóstico de prenhez.....</i>	<i>45</i>
<i>4.5 Avaliação da toxicidade materna.....</i>	<i>46</i>
<i>4.6 Desempenho reprodutivo e avaliação perinatal.....</i>	<i>46</i>
<i>4.7 Acompanhamento do ciclo estral.....</i>	<i>47</i>
<i>4.8 Análise do peso úmido e estudo histopatológico de órgãos acessórios dos aparelhos reprodutivos masculino e feminino e outros órgãos diversos.....</i>	<i>48</i>
<i>4.9 Ovariectomia de fêmeas.....</i>	<i>48</i>
<i>4.10 Avaliação do comportamento sexual.....</i>	<i>49</i>
<i>4.10.1 Orientação sexual de machos.....</i>	<i>49</i>
<i>4.10.2 Comportamento sexual de fêmeas.....</i>	<i>51</i>
<i>4.10.3 Comportamento sexual de machos.....</i>	<i>52</i>
<i>4.11 Estudo da fertilidade das proles.....</i>	<i>54</i>
<i>4.11.1 Em fêmeas.....</i>	<i>55</i>
<i>4.11.2 Em machos.....</i>	<i>56</i>
<i>4.12 Avaliação dos níveis de metabólitos de hormônios sexuais em</i>	

<i>fezes de ratos e dos níveis séricos de hormônios tireoideanos na</i>	
<i>prole adulta.....</i>	<i>56</i>
4.12.1 <i>Colheita e armazenamento do material fecal.....</i>	<i>56</i>
4.12.2 <i>Colheita e armazenamento do soro.....</i>	<i>57</i>
4.12.3 <i>Processamento das amostras fecais.....</i>	<i>57</i>
4.12.4 <i>Dosagens hormonais.....</i>	<i>59</i>
4.12.5 <i>Validação de kits para as dosagens fecais.....</i>	<i>61</i>
4.12.6 <i>Níveis dos metabólitos dos hormônios sexuais em diferentes</i>	
<i>períodos da gestação.....</i>	<i>61</i>
4.12.7 <i>Transformação das concentrações fecais determinadas por</i>	
<i>RIE.....</i>	<i>61</i>
4.13 <i>Dosagem dos níveis cerebrais de DA, HVA, DOPAC,, MHPG,</i>	
<i>VMA, 5-HT e 5-HIAA.....</i>	<i>62</i>
4.13.1 <i>Procedimentos para obtenção de amostras de</i>	
<i>homogenatos cerebrais.....</i>	<i>62</i>
4.13.2 <i>Condições cromatográficas.....</i>	<i>63</i>
4.13.3 <i>Preparo das soluções padrões de monoaminas.....</i>	<i>64</i>
5. <i>Delineamento experimental.....</i>	<i>65</i>

5.1	<i>Avaliação da toxicidade materna.....</i>	65
5.2	<i>Desempenho reprodutivo e avaliação perinatal.....</i>	66
5.3	<i>Análise do peso úmido e estudo histopatológico de órgãos.....</i>	66
5.4	<i>Avaliação do comportamento sexual.....</i>	67
5.5	<i>Estudo da fertilidade das proles.....</i>	68
5.6	<i>Dosagem dos metabólitos de hormônios sexuais nas fezes de ratos.....</i>	69
5.7	<i>Dosagem dos níveis de neuromaminas cerebrais e seus metabólitos nas regiões hipotalâmica e estriatal do SNC de ratos.....</i>	70
5.8	<i>Análise estatística.....</i>	70
6.	<i>Resultados.....</i>	72
6.1	<i>Extração e identificação de alcalóides dos frutos verdes dessecados e moídos da S.lycocarpum.....</i>	72
6.2	<i>Avaliação da toxicidade materna.....</i>	80
6.3	<i>Desempenho reprodutivo e avaliação perinatal.....</i>	88
6.4	<i>Avaliação do ciclo estral.....</i>	96
6.5	<i>Análise do peso úmido e estudo histológico de diferentes órgãos retirados.....</i>	97

6.6	<i>Avaliação do comportamento sexual</i>	107
6.6.1	<i>Orientação sexual de machos</i>	107
6.6.2	<i>Comportamento sexual de fêmeas</i>	110
6.6.3	<i>Comportamento sexual de machos</i>	111
6.7	<i>Estudo da fertilidade das proles</i>	115
6.8	<i>Dosagem hormonal</i>	120
6.8.1	<i>Níveis séricos dos hormônios tireoideanos</i>	120
6.8.2	<i>Níveis fecais dos metabólitos dos hormônios sexuais</i>	123
6.9	<i>Dosagem das neuroaminas cerebrais</i>	133
7.	<i>Discussão</i>	144
8.	<i>Conclusões</i>	159
9.	<i>Referências</i>	160
10.	<i>Anexos</i>	

Lista de Figuras

	Página
Figura 1 - <i>Solanum lycocarpum</i> St. Hillaire (Solanaceae)	12
Figura 2 - Glicoalcalóides esteroidais solamargina (A) e solasonina (B), e a aglicona esteroidal solasodina (C)	13
Figura 3 – Fluxograma do procedimento adotado para a extração dos glicoalcalóides esteroidais solamargina e solasonina dos frutos verdes dessecados e moídos da <i>S. lycocarpum</i>	41
Figura 4 – Fluxograma com o procedimento de isolamento e quantificação dos glicoalcalóides esteroidais solamargina e solasonina	44
Figura 5 – Arena empregada para a mensuração da orientação sexual de machos em vida adulta (PN100)	50
Figura 6 - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) do glicoalcalóide esteroidal solamargina presente na porção de alcalóides totais obtida pelo processo de extração de glicoalcalóides empregado nos frutos verdes dessecados e moídos da <i>S. lycocarpum</i>	76
Figura 7 - Ressonância magnética nuclear de carbonos (^{13}C) do glicoalcalóide esteroidal solamargina presente na porção de alcalóides totais obtida pelo processo de extração de glicoalcalóides empregado nos frutos verdes dessecados e moídos da <i>S. lycocarpum</i>	77
Figura 8 - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) do glicoalcalóide esteroidal solasonina presente na porção de alcalóides totais obtida pelo processo de extração de glicoalcalóides empregado nos frutos verdes dessecados e moídos da <i>S. lycocarpum</i>	78
Figura 9 - Ressonância magnética nuclear de carbonos (^{13}C) do glicoalcalóide esteroidal solasonina presente na porção de alcalóides totais obtida pelo processo de extração de glicoalcalóides empregado nos frutos verdes dessecados e moídos da <i>S. lycocarpum</i>	79
Figura 10 – Peso e ganho de peso das mães tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação	83
Figura 11 - Consumo de ração (A e B) e ingestão hídrica (C e D) de ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação e lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	87

Figura 12 - Alguns parâmetros analisados no estudo do desempenho reprodutivo de mães tratadas durante a gestação com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	90
Figura 13 – Peso e ganho de peso de filhotes fêmeas (A e C) e de filhotes machos (B e D) expostos ou não (grupo controle) durante a gestação e início da lactação aos frutos da <i>S. lycocarpum</i>	95
Figura 14 – Razão peso úmido de órgãos/peso corporal (10^{-3}) da prole feminina aos PN 14, PN 21, PN 30, PN 60 e PN 90, cujas mães foram tratadas ou não (controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação	102
Figura 15 – Razão peso úmido de órgãos/peso corporal (10^{-3}) da prole masculina aos PN 14, PN 21, PN 30, PN 60 e PN 90, cujas mães foram tratadas ou não (controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação	104
Figura 16 – Corte histológico de útero de filhotes fêmeas controle (A e B) e experimental (C e D) com PN 60.....	105
Figura 17 - Corte histológico de testículo de filhotes machos controle (A e B) e experimental (C e D) com PN 60.....	106
Figura 18 - Orientação sexual (tempo de permanência, em segundos, em cada área da arena) de ratos machos adultos com PN 90 cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG06 a DG22) e início da lactação (até PN 07) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	109
Figura 19 - Coeficiente de lordose de ratas fêmeas (PN 100) cujas mães foram tratadas ou não (controle) durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	110
Figura 20 – Comportamento sexual de ratos machos adultos (PN 100) cujas mães foram tratadas ou não (controle) durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	114
Figura 21 – Estudo da fertilidade de ratas fêmeas em idade adulta (PN 100) cujas mães foram ou não (controle) tratadas durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	117
Figura 22 – Estudo da fertilidade de ratos machos em idade adulta (PN 100) cujas mães foram ou não (controle) tratadas durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	119

Figura 23 - Concentrações séricas dos hormônios tireoideanos T3 (A) e T4 (B) em ratos adultos (PN 90) cujas mães foram ou não tratadas durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos da <i>S. lycocarpum</i>	122
Figura 24 - Representação gráfica da validação fisiológica referente a concentração dos hormônios esteroidais progesterona (A), estradiol (B) e testosterona (C) em fêmeas durante a gestação (dias 01, 07, 14 e 21)	124
Figura 25 - Concentração de metabólitos de estrogênios em fezes de ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-22) e início da lactação (PN 01-07) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	128
Figura 26 - Concentração de progestinas (ng/g) em fezes de ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-22) e início da lactação (PN 01-07) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	130
Figura 27 - Concentração de metabólitos de testosterona (µg/g) em fezes de ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-22) e início da lactação (PN 01-07) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	132
Figura 28 - Análise dos sistemas e dos níveis estriatais de noradrenalina, dopamina, serotonina e seus respectivos metabólitos (ng/g) em ratos machos e fêmeas adultos, com PN 140, cujas mães foram tratadas ou não com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e início da lactação	138
Figura 29 - Análise dos sistemas e das concentrações hipotalâmicas de noradrenalina, dopamina, serotonina e seus respectivos metabólitos (ng/g) em ratos machos e fêmeas adultos, com PN 140, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e início da lactação	143

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1 – Peso corporal de ratas tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação.	81
Tabela 2 – Ganho de peso corporal de ratas tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação.	82
Tabela 3 – Consumo de ração (g) de ratas tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão e a concentração média (g) dos glicoalcalóides solamargina e solasonina ingeridos pelas ratas experimentais nos diversos dias de análise	85
Tabela 4 – Ingestão hídrica (ml) de ratas tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação.	86
Tabela 5 – Desempenho reprodutivo de ratas tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação.	89
Tabela 6 – Peso corporal da prole de ratos cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação.	92
Tabela 7 – Ganho de peso da prole de ratos cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação.	94
Tabela 8 – Duração (em dias) em cada fase do ciclo estral analisado por 21 dias em fêmeas adultas cujas mães foram tratadas ou não (controle) durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	96
Tabela 9 – Peso úmido de órgãos (g) de ratas tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes de <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação. As mães foram eutanasiadas no 21º dia da lactação (PN 21).	100
Tabela 10 – Razão peso úmido de órgãos/peso corporal (10^{-3}) da prole feminina aos PN 14, PN 21, PN 30, PN 60 e PN 90, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos	

verdes dessecados e moídos de <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação.	101
Tabela 11 – Razão peso úmido de órgãos/peso corporal (10^{-3}) da prole masculina nos dias PN 14, PN 21, PN 30, PN 60 e PN 90, cujas mães foram tratadas ou não (controle) com ração contendo 10% de frutos verdes de <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e lactação.	103
Tabela 12 – Tempo de permanência (segundos) em diferentes áreas de uma arena projetada para a mensuração da orientação sexual de ratos machos adultos (PN 90) cujas mães foram tratadas durante a gestação (DG 06 a DG 22) e início da lactação (até PN 07) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	108
Tabela 13 – Coeficiente de lordose de ratas fêmeas com PN 100 cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i>	110
Tabela 14 – Comportamento sexual de ratos machos, com PN 100, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação e início da lactação.	112
Tabela 15 - Índice de atividade sexual, frequência de montas/minuto, frequência de intromissões/minuto, eficiência copulatória e índice neuromotor de ratos adultos (PN 100) cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06 a DG 22) e início da lactação (até PN 07) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos da <i>S. lycocarpum</i>	113
Tabela 16 – Parâmetros avaliados no estudo da fertilidade realizada em fêmeas adultas (PN 100) cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-DG 22) e lactação (PN 01 - PN 07) com ração contendo 10% de frutos verdes e moídos de <i>S. lycocarpum</i>	116
Tabela 17 – Parâmetros avaliados no estudo da fertilidade realizada com machos adultos (PN 100) cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-DG 22) e lactação (PN 01-PN 07) com ração contendo 10% de frutos verdes e moídos de <i>S. lycocarpum</i>	118
Tabela 18 – Concentrações séricas dos hormônios tireoideanos T3 - triiodotironina (ng/ml) e T4 - tiroxina (μ g/ml) de ratos com 90 dias de idade cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle), durante a gestação e início da lactação, com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos da <i>S. lycocarpum</i>	121
Tabela 19 – Concentração de metabólitos fecais de estrogênios (ng/g) em ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-22) e	

início da lactação (PN 01-07) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i> , nos dias DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21, e em sua prole ao completarem PN 30, PN 60 e PN 90.	127
Tabela 20 – Concentração de metabólitos fecais de progestinas (ng/g) em ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-22) e início da lactação (PN 01-07) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i> , nos dias DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21, e em sua prole ao completarem PN 30, PN 60 e PN 90.	129
Tabela 21 – Concentração de metabólitos fecais de testosterona (µg/g) em ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-22) e início da lactação (PN 01-07) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i> , nos dias DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21, e em sua prole ao completarem PN 30, PN 60 e PN 90.	131
Tabela 22 – Concentração (ng/g) no estriato de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos MHPG, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, e atividade dos sistemas em ratos machos e fêmeas adultos, com PN 140, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação (DG 06-22) e lactação (PN 01-07).	137
Tabela 23 – Concentrações (ng/g) hipotalâmicas de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos MHPG, HVA, VMA, 5-HIAA e DOPAC e atividades dos sistemas em ratos machos e fêmeas adultos com PN 140, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes da <i>S. lycocarpum</i> durante a gestação (DG 06-22) e lactação (PN 01-07).	142

Resumo

A *Solanum lycocarpum* St. Hil (Solanaceae) é uma planta nativa do cerrado brasileiro, cujos frutos possuem os glicoalcalóides esteroidais solasonina e solamargina. É possível que a ingestão de frutos que contenham esses glicoalcalóides possam interferir no equilíbrio do sistema endócrino. O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos tóxicos provenientes da ingestão diária de frutos verdes da *S. lycocarpum* (10% na ração) por ratas prenhes, a partir do 6º dia da gestação (DG 06) ao 7º dia pós-natal (PN 07). Os princípios ativos isolados dos frutos da planta mostraram a presença de 0,021% de solamargina e 0,031% de solasonina. A exposição das mães à planta alterou alguns parâmetros do desempenho reprodutivo; foram observados redução tanto do peso como do comprimento corporal das ninhadas experimentais ao nascimento, um ou dois filhotes mortos ao nascimento em 20% das ninhadas experimentais e menor capacidade em adquirir peso do nascimento à vida adulta. A prole experimental adulta fêmea apresentou degeneração de células epiteliais uterinas no dia PN 60, não sendo mais observada esta alteração no dia PN 90. A avaliação do comportamento sexual de fêmeas (PN 100) mostrou redução do coeficiente de lordose das fêmeas experimentais quando comparado com o coeficiente de lordose das fêmeas do grupo controle. Na prole experimental masculina (PN 60 e PN 90) observou-se importante degeneração de células germinativas dos ductos testiculares. Por outro lado, o comportamento sexual desta prole não mostrou-se alterado. Na avaliação de neuroaminas cerebrais, a prole feminina apresentou maior atividade do sistema noradrenérgico estriatal, caracterizada por redução dos níveis de noradrenalina, sem alteração dos níveis de seu metabólito ácido vanilmandélico (VMA), e reduzida atividade do sistema serotoninérgico hipotalâmico, caracterizada por elevação dos níveis de serotonina (5-HT) sem alteração dos níveis de seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Os filhotes machos apresentaram concentrações reduzidas de noradrenalina, VMA e ácido homovanílico (HVA). Ambos, machos e fêmeas, apresentaram níveis estriatais diminuídos de dopamina e seu metabólito ácido di-hidroxifenilacético (DOPAC), sem, contudo, alterar a atividade do sistema dopaminérgico. Não foram observadas alterações hormonais tanto nas mães, quanto na prole, avaliadas por meio da mensuração não invasiva de metabólitos dos hormônios progesterona, estradiol e testosterona nas fezes. Estes dados tomados em conjunto indicam que a planta promoveu leve toxicidade materna e apresentou leve efeito fetotóxico. A avaliação das proles do nascimento à vida adulta indicou ainda que os glicoalcalóides esteroidais presentes nos frutos provocaram efeitos diferenciados nas proles feminina e masculina e possivelmente apresentam atividade estrogênica.

Palavras chaves: *Solanum lycocarpum*, solamargina, solasonina, toxicologia perinatal, comportamento sexual, rato.

Abstract

Solanum lycocarpum St. Hil (Solanaceae) is a native shrub of the Brazilian savanna. The fruits contain steroidal glycoalkaloids, solasonine and solamargine, that can disrupt the endocrine system once in the body by ingestion of *S. lycocarpum* fruit. The present study was performed in order to determine the possible toxic effects of *S. lycocarpum* fruit ingestion (10% added in the diet) by pregnant rats from gestation day (GD) 06 to post-natal day (PND) 07. The unripe fruits employed contain 0.021% of solamargine and 0.031% of solasonine. *S. lycocarpum* 10% in the diet, during pregnancy and beginning of lactation, did not impair gestation but alterations in some parameters of the reproductive performance were observed: lower body weight and body size of the experimental litters at PND 01, one or two stillbirths were observed in 20% of the experimental litters and reduced weight gain of the pups from birth to adulthood. Female offspring (PN 60) presented reversible uterine epithelial cell degeneration, and at PND 100, presented impaired sexual behavior characterized by reduced lordosis quotient. Male offspring (PN 60 and PND 90) showed irreversible degeneration of testis germinative cells and normal sexual behavior. The central neuroamine systems evaluation presented, in the female exposed offspring, increased activity of striatal norepinephrine system, with reduced levels of norepinephrine (NOR) and normal levels of vanilmandelic acid (VMA), and reduced activity of the hypothalamic serotonergic system, with increased serotonin (5-HT) and normal 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) levels. Exposed male offspring presented reduced hypothalamic NOR, VMA and homovanilic acid (HVA) levels, and both males and females presented striatal dopamine (DA) and dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) reduced levels, without alterations in the activity of the dopaminergic system. The sexual hormones were also evaluated by a non invasive method with feces extraction. However no alterations were observed in progesterone, estradiol and testosterone metabolite levels in dams and offspring feces. Present data showed light maternal toxicity and light fetotoxic effects. The evaluation of the offspring from birth to adult age indicate that the steroidal glycoalkaloids present in the fruit act by different ways in male and female fetuses, and perhaps presents estrogenic activity.

Key words: *Solanum lycocarpum*, solamargine, solasonine, perinatal toxicology, sexual behavior, rat.

1. Introdução

Os alcalóides esteroidais são metabólitos secundários que possuem um átomo de nitrogênio incorporado no esqueleto da estrutura básica esteroidal, anexado no ciclo pentanoper-hidrofenantreno. Por apresentarem estrutura semelhante a dos anabólicos esteroidais, hormônios esteroidais e corticosteróides, os alcalóides esteroidais têm sido alvo de pesquisas e investigações farmacológicas, uma vez que muitas destas estruturas facilmente são convertidas a hormônios esteroidais ativos. As plantas das famílias Apocynaceae, Bruxaceae, Liliaceae e Solanaceae são as mais ricas fontes para obtenção de alcalóides esteroidais e importantes objetos de estudo para a elucidação de novas estruturas químicas com atividade esteroidal (ATTA-UR-RAHMAN e CHOUDHARY, 1998).

As plantas da família Solanaceae são fontes de diferentes tipos de bases esteroidais. Mais de 350 glicoalcalóides já foram isolados de várias espécies de *Solanum* (RIPPERGER, 1998). Os triterpenos e os esteróides encontrados nas plantas são precursores essenciais para a biossíntese de todos os alcalóides esteroidais. Esta biossíntese inicia-se por acetilação (via acetil coenzima A) do colesterol ou equivalentes biogénéticos presentes na planta (ATTA-UR-RAHMAN e CHOUDHARY, 1998). Todos os alcalóides esteroidais encontrados em espécies de *Solanum* possuem estrutura constituída por 27 carbonos e, a partir de diferenças estruturais observadas, foram divididos em 5 tipos: solanidinas, espirosolanos, solacongestidinas, solanocapsinas e jurbidinas (PRELOG e JEGER, 1960).

Nas plantas, cadeias de carboidratos geralmente encontram-se ligados à estrutura dos alcalóides, dando origem aos glicoalcalóides. É possível que a união de carboidratos aos alcalóides ocorra por conjugação glicurônica, catalisada pelas enzimas glicuroniltransferases. Corroborando esta hipótese, frações de proteínas solúveis obtidas de plantas mostraram-se capazes de catalisar as reações efetuadas pelas enzimas UDP-glicuroniltransferases sobre os alcalóides esteroidais. Os produtos obtidos talvez sejam intermediários na biossíntese de glicoalcalóides esteroidais específicos (PASZKOWSKI et al., 2001).

A atividade biológica dos glicoalcalóides presentes nas plantas do gênero *Solanum* derivam principalmente de duas propriedades: da habilidade de se complexarem a receptores presentes na membrana celular, promovendo perda da integridade e da função da mesma, e da capacidade de inibirem a enzima acetilcolinesterase (RODDICK, 1996). Uma vez que são encontrados em espécies comestíveis como a batata, tomate e berinjela, sintomas tóxicos experienciados por animais e até mesmo pelo homem já foram relatados, e muitos estudos já foram realizados para elucidar os efeitos nocivos provenientes da freqüente ingestão pelo homem. Entre os sinais e sintomas estão as cólicas abdominais e estomacais, gastroenterites, diarréias, vômitos, sensação de queimação na boca e lábios, febre, pulso rápido e cefaléias (FRIEDMAN et al., 1996). Os estudos foram realizados com a batata (KEELER et al., 1976; MAGA, 1980; JADHAV et al., 1981), com o tomate (JADHAV et al., 1981; FRIEDMAN et al., 1996; FRIEDMAN et al., 2003) e com a berinjela (BAJAK et al., 1979; AUBERT et al., 1989; FRIEDMAN et al., 1996; PASZKOWSKI et al., 2001), que são os principais alimentos da espécie *Solanum* consumidos pelo ser humano que, sabidamente,

apresentam glicoalcalóides esteroidais. Assim, os mais bem conhecidos e estudados glicoalcalóides são a solanina e a chaconina, presentes na batata (RIPPERGER e SCHREIBER, 1981). Por ser um alimento consumido abundantemente em todo mundo, e pela enorme preocupação quanto aos efeitos dos glicoalcalóides no organismo humano, estipulou-se um valor de consumo seguro máximo aceitável por dia de glicoalcalóides presentes na batata, sendo este de 1 mg/kg de peso corporal. A dose tóxica está estimada em 1,75 mg/kg e a letal entre 3 a 6 mg/kg (FRIEDMAN et al., 2003).

Entre as plantas do gênero *Solanum*, encontra-se a *Solanum lycocarpum* Saint Hilaire (Figura 1), popularmente conhecida como lobeira ou fruta do lobo. A *S. lycocarpum* é uma planta arbustiva nativa das regiões do cerrado brasileiro (LORENZI, 1991; KISSMAN e GROTH, 1995). Seu fruto é uma baga verde globosa, volumosa e carnuda, amarelada quando madura, revestida de pilosidade, pesando até 500 g (CORRÊA, 1984). Os frutos apresentam os glicoalcalóides esteroidais solamargina (Figura 2A) e solasonina (Figura 2B), dois dos glicoalcalóides mais encontrados nas plantas do gênero *Solanum* (ELTAYEB et al., 1997). A aglicona solasodina (Figura 2C), porção destes componentes que pode ser empregada na produção de drogas esteroidais por possuir configuração estereoespecífica para a biossíntese de esteróides, pode dar origem, por exemplo, ao composto acetato de 16-di-hidroepiandrosterona (Schering-Ploug, Munique-Alemanha), substância de partida para a produção, em laboratório, de andrógenos (GOSWANI et al., 2003), e à 3- β -acetoxipregna-5-16-dien-20-ona (HARAGUCHI et al., 1978), substância de partida para a produção, em laboratório, de progesterona. Por esta importante característica, muito já se estudou sobre a

Figura 1 – *Solanum lycocarpum* St. Hil (Solanaceae)

Figura 2 – Glicoalcalóides esteroidais solamargina (A) e solasonina (B), e a aglicona esteroidal solasodina (C).

presença (MOTIDOME et al., 1970; RIZK e ABOU-ZIED, 1970; SALEH, 1970; MAHATO et al., 1980; FUKUHARA e KUBO, 1991; KERBER et al., 1993; BARUA et al., 1997; MOLA et al., 1997; WEISSENBERG, 2001; WANYONYI et al., 2002), a biossíntese (INDRAYANTO et al., 1996; BARUA et al., 1997; ARGÔLO et al., 2000; PUTALUN et al., 2003) e a degradação (HALMOS et al., 1966; SATO e NAGAI, 1972; FONIN et al., 1996; INDRAYANTO et al., 1996; ELTAYEB et al., 1997) deste alcalóide esteroidal em diversas espécies de plantas da família das Solanaceas.

A biossíntese de glicoalcalóides esteroidais, como a solamargina e solasonina, possivelmente ocorre por reações de conjugação, no interior da plantas. Estudo realizado com extratos protéicos obtidos de folhas da *S. melongena* (PAZKOWSKI et al., 2001), por exemplo, mostrou que as enzimas UDP-glicuronil transferases presentes nestes extratos catalizam eficientemente a glicosilação da solasodina. O produto obtido desta reação, identificado como 3- β -D-monoglicosídeo de solasodina, provavelmente é um produto intermediário na biossíntese da solamargina. Muitos fosfolipídeos, naturalmente encontrados nas folhas e frutos da *S. melongena*, podem interferir na atividade da UDP glicuronil transferase. Esta ação pode ser importante na regulação *in vivo* da biossíntese de glicoalcalóides por plantas do gênero *Solanum*, como a *S. lycocarpum*. PAZKOWSKI et al. (2001) sugerem ainda a possibilidade da glicosilação de alcalóides esteroidais ser catalisada por uma única enzima, cuja especificidade e ação mostra-se dependente da estrutura e quantidade de fosfolipídeos presentes na planta, não se tratando, portanto, de uma propriedade estática da enzima.

Os glicoalcalóides esteroidais solamargina e solasonina são do tipo espirosolano. Aproximadamente 50 alcalóides do tipo espirosolano são conhecidos. Entre eles estão as saponinas e sapogeninas (ATTA-UR-RAHMAN e CHOUDHARY, 1998). A solamargina e solasonina diferem-se pela cadeia de trioses ligada à aglicona solasodina. A cadeia de trioses da solamargina é constituída por uma molécula de glicose e duas moléculas de ramnose, denominada por cadeia chacotriose (Figura 2A), e a cadeia de trioses da solasonina é constituída pelos carboidratos galactose, ramnose e glicose, conhecida por cadeia solatriose (Figura 2B) (CHAMI et al., 2003).

Sabe-se que os glicoalcalóides ligados à cadeia chacotriose, como a solamargina, possuem maior capacidade de se ligarem aos receptores da membrana celular, promovendo, de forma mais eficaz, a perda da integridade e da função da mesma, quando comparados com os glicoalcalóides ligados à cadeia solatriose. Entretanto, o motivo deste comportamento ainda não está bem esclarecido (RODDICK et al., 2001). Quando encontrados juntos na planta, existem evidências de que os chacotriosídeos e os solatriosídeos tem seus efeitos potencializados (FEWELL et al., 1994). A maior atividade apresentada pelos chacotriosídeos foi observada em estudos *in vitro* onde verificou-se maior ligação da solamargina a receptores da membrana celular em comparação à solasonina (RODDICK et al., 1992), e onde constatou-se as duas moléculas de ramnose na estrutura da solamargina como fator desencadeante para a promoção da morte celular (CHANG et al., 1998; KUO et al., 2000). Sabe-se também que, por serem glicoalcalóides do tipo espirosolano, tanto a solamargina quanto a solasonina não apresentam a propriedade de inibir a enzima acetilcolinesterase, ação

demonstrada pelos glicoalcalóides solanidínicos solanina e chaconina presentes na batata, pelo fato de não apresentarem o anel indolizídínico em sua estrutura (RODDICK et al., 2001).

Os glicoalcalóides solamargina e solasonina mostraram significativa atividade antineoplásica em cultura de células (CHAM, 1988; CHAM e DAUNTER, 1990b; DAUNTER e CHAM, 1990), em animais (SINGH et al., 1979; CHAM et al., 1987; CHAM, 1988; CHAM e DAUNTER, 1990a) e em humanos (CHAM e MEARES, 1987; CHAM, 1988; CHAM e DAUNTER, 1989; CHAM e DAUNTER, 1990b). A cadeia de açúcares da solamargina e solasonina, mais especificamente o carboidrato ramnose, natural em plantas mas não em células animais, se liga a sítios endógenos específicos presentes na membrana de células susceptíveis. Assim, a aglicona solasodina penetra na célula provocando a morte celular por lise dos lisossomos e por ativar a via apoptótica, uma vez no interior do núcleo da célula (CHAM e DAUNTER, 1991; DAUNTER e CHAM, 1990). O carboidrato ramnose presente nos glicoalcalóides não é encontrado nas células de mamíferos e especula-se a respeito da presença de receptores específicos para a ramnose em células tumorais. Foi demonstrado que o carboidrato ramnose presente em uma solução constituída pelos glicoalcalóides solamargina e solasonina inibiu os efeitos citotóxicos de tumores artificialmente induzidos em camundongos e que, a solasodina não é efetiva em inibir o crescimento das células cancerosas como são os glicoalcalóides (CHAM e DAUNTER, 1990). Os glicoalcalóides também possuem atividade antifúngica (CIPOLLINI e LEVEY, 1997) além de inibirem o crescimento de larvas das espécies *Triboleum castaneum* e *Sexta manduca* (WEISSENBERG et al., 1998) e mostrarem-se embriotóxicos, por impedirem o

adequado desenvolvimento de embriões de sapos (BLANKEMEYER et al., 1998), reforçando o hipotético mecanismo de ação de que se ligam a receptores específicos na membrana de células susceptíveis, promovendo perda da função e consequente morte celular (KEUKENS et al., 1996).

A solasodina (3 β -22 α -25R-spirosol-5-en-3-ol, solasod-5-em-3 β -ol ou Δ^5 -20 β -22 α -25 α -27-azaspirosten-3 β -ol) alcalóide do tipo espirosolano, conhecida também como solancarpidina, solanidina-s e purapuridina (THE MERCK INDEX), pode ser considerada, pela indústria farmacêutica, como mais uma fonte natural para a produção do composto acetato de 16-di-hidropregnenolona, de imensa importância medicinal, assim como a diosgenina obtida de plantas da família das *Dioscoreae* (ATTA-UR-RAHMAN e CHOUDHARY, 1998).

A solasodina é sintetizada pela via do acetato-melavonato, envolvendo também o esqualeno e seu produto o colesterol, como intermediários necessários para a sua formação (JADHAV et al., 1981). Uma vez absorvida, ela se insere na célula por difusão passiva, após ligação das trioses a receptores na membrana celular. No interior das células reversivelmente se liga a esteróides na membrana, inibindo a conversão enzimática do di-hidrolanosterol ao colesterol (KUSANO et al., 1987), provocando a lise dos lisossomos com consequente liberação de suas enzimas e a morte celular (CHAM e DAUNTER, 1990). Quando aumenta-se muito o número de complexos glicoalcalóide/receptor, aumenta-se também a interação entre os açúcares das cadeias de carboidratos dos glicoalcalóides. Assim, uma barreira sobre a membrana da célula é formada e, a medida que esta cresce, provoca disfunção e degeneração da membrana celular. A intensidade desta

disfunção vai depender da concentração dos glicoalcalóides e da concentração e natureza do colesterol disponível no interior da célula (KEUKENS et al., 1996).

A solasodina foi e continua sendo alvo de intensos estudos. É sabido que apresenta propriedades contraceptivas em primatas (DIXIT et al., 1989) e cães (DIXIT e GUPTA, 1982), propriedades teratogênicas (má-formação cranio facial) em hamsters (KEELER et al., 1976; KEELER et al., 1990; GAFFIELD e KEELER, 1996), propriedades hepatotóxicas reversíveis, uma vez que se observou reversibilidade de hepatomegalia em camundongos após interrupção da ingestão de solasodina (FRIEDMAN et al., 1996), menor ganho de peso e hepatomegalia em camundongos prenhes e não prenhes tratados por 14 dias com 12,4 mmol/kg de solasodina (FRIEDMAN et al., 2003), morte e necrose das mucosas gástrica e intestinal de hamsters tratados com uma única dose de solução aquosa de frutos de diferentes espécies de *Solanum* (BAKER et al., 1989).

Estudo realizado em humanos e hamsters demonstraram que a solasodina se acumula no organismo, mantendo-se retida por tempo prolongado (CLARINGBOLD et al., 1980). Neste estudo dois homens receberam, por via intravenosa, 10 ml de uma solução de ^3H -solasodina (10uCi/ml etanol); amostras de sangue, urina e fezes foram coletadas periodicamente (até 192 horas após a administração). Nove hamsters empregados receberam, por via intravenosa, 0,5 ml de uma solução contendo 10 UI/ml de ^3H -solasodina; amostras de sangue e urina foram coletados até 200 horas após a administração e também porções teciduais (fígado, coração, ovários, testículos, útero, etc.) foram coletadas em diversos intervalos de tempo (até 62 dias após a administração). Após 72 horas da administração em seres humanos apenas 7% do tritium injetado na forma ^3H -

solasodina havia sido eliminada na urina, sugerindo que provavelmente a maior parte continuaria ligado a esteróides. O estudo da depuração no sangue mostrou tempo de meia vida prolongado (aproximadamente 100 horas). A excreção de ^3H -solasodina nas fezes mostrou-se três vezes superior à excreção na urina. Porém, as excreções fecal e urinária em conjunto, nos 5 primeiros dias após a administração, totalizaram apenas 30% da concentração inicial de ^3H -solasodina. Assim, exclui-se a biotransformação hepática e recaptura biliar como principais vias de eliminação da solasodina. Estes indicadores de retenção prolongada de solasodina e/ou seus metabólitos no homem foram semelhantes àqueles observados em hamsters. A meia vida de trítium nos hamsters foi de 45 horas (excreção urinária); em 200 horas, 26% do trítium havia sido excretado por esta via. Pequenas concentrações de trítium foram encontradas nos tecidos analisados. Somente no fígado as concentrações de solasodina encontradas permitiram quantificação, onde 11,3% correspondeu à solasodina em sua forma livre e 2,5% em sua forma conjugada. Assim, a ingestão diária de alimentos contendo quantidades apreciáveis de glicoalcalóides, pode promover importante acúmulo e retenção das agliconas correspondentes e/ou metabólitos no organismo, uma vez que a ingestão ocorre em tempo superior ao tempo necessário para a depuração completa da substância.

Compostos com ação hormonal ativa são amplamente encontrados na natureza. As isoflavonas, por exemplo, constituem um grupo de fito-hormônios naturais, presentes na forma de glicosídeos conjugados, em várias plantas consumidas pelo homem e animais (ZAVA et al., 1997; WISEMAN, 1999). Sabe-se que o colesterol é o componente de partida para a produção endógena de

hormônios sexuais. Se a solasodina e, conseqüentemente, os glicoalcalóides solamargina e solasonina inibem a produção endógena de colesterol, estes componentes podem ser considerados desreguladores endócrinos e fitoestrógenos, devido a semelhança estrutural com o estradiol e pela habilidade de agirem como agonistas ou antagonistas estrogênicos (OSOSKI e KENELLY, 2003). De fato, a solasodina mostrou efeitos antiespermatogênicos em cães (DIXIT e GUPTA, 1982) e macacos (DIXIT et al., 1989) tratados, respectivamente, com 20,0 mg/kg de solasodina por 30 dias e com 100 mg/kg de solasodina por 150 dias. Nos cães o tratamento provocou lesões testiculares, degeneração de espermatogônias, ausência de espermatozóides nos epidídimos e atividade reduzida de algumas enzimas que atuam nos órgãos sexuais acessórios. Nos macacos o tratamento provocou redução de espermátides nos testículos e de espermatozóides nos epidídimos, além de menor presença de células de Leydig. Além disso, teste *in vitro* realizado com sêmem humano e bovino mostrou que a solasodina (0,1 ml diluído em etanol 20%) diminuiu a motilidade de espermatozóides (KANWAR et al., 1990). Neste sentido, a *S. lycocarpum* como fonte natural destes glicoalcalóides esteroidais poderia, se ingerida em quantidades suficientes por período suficiente, atuar desregulando o sistema endócrino.

Grande parte da população mundial emprega a medicina natural como forma principal de cura. Plantas frescas ou seus extratos são utilizados popularmente em terapias alternativas para o tratamento de doenças, principalmente as de natureza crônica. Primeiramente usados pelos índios Xavantes como agente hipoglicêmico, os frutos da *S. lycocarpum* são hoje

empregados na medicina popular para controlar o diabetes e a obesidade e para diminuir os níveis do colesterol de baixa densidade (DALL'AGNOL e von POSER, 2000). A infusão de sua raiz é empregada no combate à hepatite, o xarope dos frutos no combate à asma e o chá de suas folhas é usado contra a tosse (CORRÊA, 1984).

O "póvilho da lobeira", é obtido através de uma solução aquosa com os frutos verdes moídos que aí permanecem macerando por 24 horas. Em seguida, o precipitado originado é filtrado, lavado algumas vezes e mantido em repouso até secagem completa. Esta preparação fitoterápica é hoje encontrada sob a forma de cápsulas e seu uso encontra-se difundido por todo o país (DALL'AGNOL e von POSER, 2000; OLIVEIRA et al., 2003a). O "póvilho da lobeira" já foi extensivamente estudado (SÁ et al., 1998 a,b; SÁ et al., 2000; PETERS et al., 2001; CHANG et al., 2002; MOTTA et al., 2002 a,b; PETERS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003a). De fato, em dois estudos iniciais realizados respectivamente em camundongos (SÁ et al., 1998a) e ratos (SÁ et al., 1998b) machos adultos, tratados durante 5 dias com 1 ou 2 mg/kg (camundongos) ou com 2 ou 4 mg/kg (ratos) do póvilho, foram observados redução no peso da vesícula seminal, próstata e hipófise dos camundongos, e redução transitória no peso dos rins e pulmões dos ratos. Em estudo posterior (SÁ et al., 2000), o póvilho administrado a ratos (60 ou 120 mg/kg) e camundongos (30 ou 60 mg/kg), duas vezes ao dia durante 15 dias, mostrou-se levemente tóxico ao sistema reprodutivo de camundongos, pois a próstata dos animais tratados com a maior dose apresentou peso reduzido. O póvilho mostrou não atuar sobre o zigoto ou sobre o transporte do embrião até o útero em estudo realizado em ratas prenhes tratadas

com esta preparação (100 mg/kg) do primeiro ao sexto dias (PETERS et al., 2001) ou do primeiro ao quarto dias da gestação (PETERS et al., 2002). Estudo semelhante também realizado em ratas prenhes (CHANG et al., 2002), porém para a avaliação de possíveis alterações no período do desenvolvimento fetal (100 mg/kg do dia 17 ao dia 20 da gestação), apresentou menor peso da placenta, dos pulmões e rins dos fetos expostos, sugerindo efeito fetotóxico. Administração do polvilho a ratas lactentes (20 mg/kg do dia 2 ao dia 16 da lactação) mostrou não afetar o comportamento materno e o desenvolvimento neuromotor (MOTTA et al., 2002b) nem o desenvolvimento físico (MOTTA et al., 2002a) das proles.

A presença da solamargina e solasonina no fitoterápico “polvilho da lobeira” é controversa. Num primeiro estudo os glicoalcalóides não foram detectados na preparação, uma vez que são substâncias hidrossolúveis, e que, portanto, permaneceriam no sobrenadante (DALL’AGNOL e von POSER, 2000). Neste mesmo estudo os únicos compostos presentes nos frutos e no fitoterápico foram os polissacárides (pectinas, mucilagens e amido). Alguns polissacárides diminuem o trânsito gástrico, promovendo sensação de saciedade e portanto, menor ingestão de alimentos, contribuindo para a absorção reduzida de nutrientes pela corrente sanguínea, possibilitando redução da concentração de glicose no sangue (SPILLER, 1994). Assim, os autores acima conferem aos polissacárides a ação hipoglicêmica do medicamento. Porém, em um segundo estudo (OLIVEIRA et al., 2003a), análise do precipitado obtido após maceração dos frutos moídos em água, sugere a presença do alcalóide solasodina, uma vez que corrida em cromatografia de camada delgada (CCD) e posterior revelação com Dragendorff (revelador constituído de nitrato de bismuto e iodeto de potássio, que reagem com

substâncias nitrogenadas, promovendo coloração) apresentou mancha com mesmo tempo de retenção do padrão de solasodina. Neste mesmo estudo, camundongos fêmeas adultas tratadas com duas doses diárias do fitoterápico (1000 ou 2000 mg/kg/dia durante 07 dias) mostraram, quando comparadas com grupos tratados com glibenclamida (agente hipoglicêmico) e estreptozotocina (agente hiperglicêmico), que o polvilho não apresenta efeito hipoglicêmico.

A partir dos estudos relatados acima esta preparação fitoterápica mostrou-se segura à saúde humana e inclusive inóqua quanto ao efeito farmacológico hipoglicêmico à ele atribuído (OLIVEIRA et al., 2003a).

Em algumas regiões de Minas Gerais os frutos são ainda ingeridos pelo homem em sua forma natural ou ainda na forma de geléias (CRUZ, 1985). Assim, análise do potencial nutricional dos frutos já foi realizada, mostrando que são fonte alternativa de vários nutrientes como a vitamina C, sacarose, fósforo e ferro, encontrados em quantidades equivalentes ou até mesmo superiores ao de frutos como o abacaxi, banana, laranja e manga (OLIVEIRA et al., 2003b).

Sobre o aspecto farmacológico, os frutos apresentaram atividade antiinflamatória após estudo realizado em camundongos machos que receberam diferentes doses (0,5; 1,0; 1,5 ou 2,0 ml/kg) de um extrato etanólico concentrado obtido a partir dos frutos verdes (VIEIRA et al., 2003). Os resultados obtidos levaram os autores à sugerirem que o alcalóide esteroideal solasodina presente no extrato seria o responsável pela ação anti-inflamatória apresentada pelo extrato etanólico dos frutos.

Contudo, pouco até então foi estudado sobre a possível ação tóxica destes frutos no organismo animal. MARUO et al. (2003 a), num primeiro estudo,

empregando ratos machos tratados por 60 dias e fêmeas tratadas por 37 dias com ração contendo 3% de frutos verdes e moídos, observaram poucas alterações, entre elas redução do peso do útero e fígado de fêmeas, que se mostraram mais susceptíveis que machos. Num segundo estudo, ratas prenhes foram tratadas com ração contendo 3% de frutos verdes moídos durante a pré-implantação (dia 1 ao dia 6 da gestação) ou organogênese (dia 6 ao dia 16 da gestação). Foram observados leves efeitos tóxicos, entre eles menor peso da placenta nas mães tratadas durante a organogênese, hemorragia no bulbo olfatório de fetos expostos durante a pré-implantação e anormalidades ósseas aumentadas em fetos expostos durante a organogênese (MARUO et al., 2003b).

SOARES (2005) empregando ratos púberes tratados com ração contendo 10% de frutos verdes moídos da *S. lycocarpum* observou menor ganho de peso dos animais ao final do tratamento (60 dias), aumento da eficiência copulatória nos machos experimentais (caracterizada por menor número de montas para a ocorrência da primeira ejaculação) e níveis alterados de hormônios sexuais em diferentes momentos do desenvolvimento de ratos púberes machos e fêmeas. A autora sugeriu que os frutos provavelmente apresentam atividade estrogênica.

O impacto de toxinas presentes em plantas sobre o embrião, feto e recém-nascido é dramático e as consequências são economicamente importantes para a indústria pecuária. Para a avaliação da real importância das intoxicações por plantas em animais, é necessário averiguar a natureza da planta de interesse e a intensidade e frequência de exposição dos animais de criação em condições naturais (PANTER et al., 1992). Sabe-se que a exposição perinatal do sistema nervoso central (SNC) aos hormônios da reprodução resulta em alterações

morfofisiológicas que promovem alterações comportamentais específicas nas espécies em vida adulta (MCCLUSKY e NAFTOLIN, 1981). Assim, estudos mais aprofundados que ajudem a elucidar os meios pelos quais esses glicoalcalóides interferem no sistema reprodutivo e no feto, provocando alterações na reprodução e na manutenção das espécies, tornam-se necessários e muito importantes.

Durante a vida intrauterina o feto se desenvolve com o hipotálamo organizado como o de fêmeas, o que determinará na vida adulta um comportamento sexual de fêmeas e um padrão cíclico dos hormônios sexuais. Para que ocorra a defeminização e a masculinização do feto, é necessário a exposição do hipotálamo à testosterona (MCCLUSKY e NAFTOLIN, 1981). A defeminização compreende a esterilidade e atrofia dos ovários e redução da capacidade de apresentar lordose e a masculinização compreende o comportamento de monta de macho (MCEWEN, 1978). De fato, um pico de testosterona, de origem testicular, ocorre nos fetos machos logo ao nascimento. A ausência de testosterona nas fêmeas mantém o cérebro feminino (CORBIER et al., 1992). Porém, o processo final da diferenciação hipotalâmica é também dependente de estrógeno que nos machos é obtida pela biotransformação da testosterona (ERSKINE et al., 1988). Portanto, a participação de andrógenos e estrógenos é importante para a complexa diferenciação do hipotálamo de machos e fêmeas. Assim, a feminização está relacionada à exposição a pequenos níveis de estrógenos. Altos níveis de estrógenos somente estarão presentes por biotransformação da testosterona, presentes em machos, levando a masculinização do hipotálamo. Porém, durante toda a gestação os fetos estão expostos aos estrogênios provenientes da placenta e da mãe. Por este motivo, o

fígado do feto produz a enzima α -fetoproteína, a qual circula em altas concentrações durante a gestação e desaparece gradualmente nas primeiras semanas de vida pós-natal (MCCLUSKY e NAFTOLIN, 1981). Esta proteína se liga a estrogênios mas não à testosterona. Portanto, a testosterona livre presente em machos atinge o SNC, onde será convertida a estradiol, ligando-se a receptores celulares de estrógenos, e os estrogênios exógenos ao organismo de fetos fêmeas, uma vez ligados à α -fetoproteína, não chegam ao cérebro.

O processo de diferenciação sexual em ratos ocorre entre os últimos dias da gestação e primeira semana após o nascimento (JACOBSON et al., 1985). Durante a gestação o SNC mostra-se mais sensível à ação dos hormônios esteroidais, necessitando da ação de estrógenos e andrógenos para a diferenciação adequada do hipotálamo (MCCLUSKY e NAFTOLIN, 1981). Se os frutos da *S. lycocarpum* possuem glicoalcalóides que interferem na biossíntese do colesterol, prejudicando ou inibindo a biossíntese de hormônios sexuais, promovendo alterações na produção endógena destes hormônios nas mães e nos fetos, certamente alterações provenientes do excesso ou falta de algum destes hormônios no hipotálamo acarretarão alterações morfofisiopatológicas no SNC dos fetos, que podem promover alterações no comportamento sexual na vida adulta. Além disso, uma vez que a solasodina apresenta estrutura semelhante ao de hormônios esteroidais, poderia agir como um desregulador endócrino, por ação anti-androgênica e/ou anti-estrogênica, alterando a masculinização hipotalâmica e, portanto, reduzindo o comportamento sexual de ratos machos, ou por ação estrogênica, levando a masculinização hipotalâmica de ratas fêmeas e reduzindo

o comportamento de lordose durante a atividade sexual (MCCLUSKY e NAFTOLIN, 1981).

De forma não menos importante, os neurotransmissores também são fundamentais, juntamente com os hormônios sexuais, para um desenvolvimento físico e reflexológico, e para um comportamento social e sexual adequados.

As catecolaminas dopamina (DA) e noradrenalina (NOR) são sintetizadas a partir do aminoácido aromático tirosina. A tirosina sofre hidroxilação enzimática pela tirosina hidroxilase, dando origem a DOPA, que por ação da DOPA-descarboxilase origina a DA. Em seguida, a dopamina β -hidroxilase cataliza a conversão enzimática da DA à NOR, e a NOR, por sua vez, inibe a ação da tirosina-hidroxilase, atuando por retroalimentação negativa (RANG et al, 1997). A maior parte da NOR e DA sintetizadas ficam contidas em vesículas nas terminações nervosas. Os corpos celulares de neurônios adrenérgicos são encontrados na ponte, principalmente no *locus ceruleus*, e bulbo, porém seus axônios se difundem por diversas áreas no cérebro como hipotálamo, córtex e cerebelo. Os corpos celulares de neurônios dopaminérgicos são encontrados principalmente na substância negra (sistema nigroestriatal), região relacionada com a atividade motora, e no mesencéfalo (*nucleus accumbens*). Também se encontram no sistema tubero-infundibular, cujos axônios partem do hipotálamo e atingem a hipófise (RANG et al, 1997). A liberação de NOR e DA ocorre por abertura de canais de cálcio na membrana celular, decorrente da despolarização consequente de um impulso nervoso. O cálcio penetra nas células promovendo a liberação destas monoaminas das vesículas para a fenda sináptica, atingindo os seus receptores. Em seguida a NOR e a DA são recapturadas ou degradadas. Os

principais receptores adrenérgicos (todos acoplados à proteína G) são os α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e β_3 . Os principais receptores dopaminérgicos (todos acoplados à proteína G) são os D_1 , D_2 , D_3 , D_4 e D_5 (RANG et al, 1997). A degradação das monoaminas não recapturadas ocorre por ação das enzimas monoamino-oxidase (MAO) e catecol-O-metiltransferase (COMT). A MAO degrada a NOR ao ácido 3-metóxi-4-hidroximandélico (VMA) e a DA ao ácido di-hidroxifenilacético (DOPAC), enquanto a COMT degrada a NOR à 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) e a DA ao ácido homovanílico (HVA) (RANG et al, 1997).

A 5-hidroxitriptamina (5-HT) é encontrada em abundância nas células da parede intestinal, nas plaquetas e no cérebro. Os corpos celulares de neurônios serotoninérgicos se encontram principalmente na ponte e parte superior do bulbo, regiões conhecidas como *núcleos da rafe*. Seus axônios projetam-se para o hipocampo, hipotálamo, sistema límbico e córtex, apresentando uma ampla disseminação (RANG et al, 1997). A biossíntese se inicia com o aminoácido precursor triptofano, obtido da dieta, que por reação catalizada pela enzima triptofano-hidroxilase, dá origem ao 5-hidroxitriptofano que, por ação da enzima dopa-descarboxilase, origina a 5-HT; esta, por fim, é armazenada em vesículas nos neurônios pré-sinápticos. Quando liberada na fenda sináptica, atua em receptores específicos e é em seguida recapturada (RANG et al, 1997). Há vários tipos de receptores serotoninérgicos. Os receptores 5-HT₁ são acoplados à proteína G (inibem a adenilato-ciclase), encontrados principalmente no cérebro, e seus efeitos são predominantemente inibitórios; apresenta os subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1C}, 5-HT_{1D} (5-HT_{1D α} e 5-HT_{1D β}), 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F}. Os receptores 5-HT₂ são vinculados à fosfolipase C, mais importantes na periferia do que no sistema

nervoso central e apresentam os subtipos 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}. Os receptores 5-HT₃ ocorrem principalmente no sistema nervoso periférico e estão diretamente ligados aos canais iônicos da membrana, não envolvendo segundos mensageiros. Os receptores 5-HT₄, 5-HT₆ e 5-HT₇ estimulam a adenilato-ciclase e atuam principalmente no sistema nervoso entérico. O receptores 5-HT₅ estão acoplados a proteína G porém não se sabe o segundo mensageiro envolvido. A degradação da 5-HT ocorre principalmente pela MAO, com formação do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), excretado na urina (RANG et al, 1997; UPHOUSE, 2000).

Os neurotransmissores NOR, DA e 5-HT são importantes para uma função neuroendócrina equilibrada. A ação direta de andrógenos durante o desenvolvimento de um ou mais destes sistemas de aminas cerebrais certamente provocará alterações profundas e permanentes nestes sistemas, que podem promover alterações na diferenciação sexual (GONZÁLEZ e LERET, 1992). Assim, a administração de agentes farmacológicos que sabidamente alteram a atividade de sistemas de neuroaminas cerebrais podem alterar o comportamento sexual de animais quando adultos (DORNER et al, 1977; HULL et al, 1984).

Sabe-se que a dopamina, em circunstâncias apropriadas, estimula o comportamento sexual. Foi observado que agonistas dopaminérgicos reduzem a latência para a primeira monta em ratos castrados tratados com testosterona (0,4 mg/kg/semana), enfatizando os efeitos estimulantes da DA sobre o comportamento sexual (AGMO e FERNÁNDEZ, 1989). Porém, os efeitos estimulatórios de agonistas dopaminérgicos devem ser compreendidos como consequência das alterações nas concentrações centrais de dopamina, não

havendo razões para enquadrá-lo como neurotransmissor único para que ocorra o comportamento sexual. De fato, HULL et al (1997) ressaltam que a DA facilitaria o acesso às vias hormonais primárias, favorecendo o comportamento sexual.

A 5-HT inibe a receptividade sexual (MEYERSON, 1964) e parece estar envolvida no reflexo de lordose de ratas fêmeas (MENDELSON, 1992). Os receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ foram os mais estudados quanto aos possíveis efeitos que exercem sobre a lordose. Agentes que ativam os receptores 5-HT_{1A} geralmente inibem a lordose em fêmeas, enquanto a ativação dos receptores 5-HT₂ e 5-HT₃ parece favorecer este reflexo. Portanto, o papel da 5-HT como controladora da lordose ainda não foi claramente elucidado. (UPHOUSE, 2000).

Considerando os dados acima descritos e que os frutos da *S. lycocarpum* podem ser ingeridos por animais de criação durante a gestação, este trabalho teve como objetivo estudar os possíveis efeitos tóxicos em ratas prenhes tratadas com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* na gestação e lactação, avaliando-se os efeitos na esfera reprodutiva e na atividade dos sistemas monoaminérgicos centrais da prole.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho visou estudar os possíveis efeitos tóxicos em ratas prenhes tratadas com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* na gestação e lactação, avaliando-se os efeitos na esfera reprodutiva e na atividade dos sistemas monoaminérgicos centrais da prole.

2.2 Objetivos específicos

Foram avaliados:

- a constituição fitoquímica dos frutos;
- a toxicidade materna;
- o desempenho reprodutivo das mães;
- o desenvolvimento físico das proles;
- o estudo histopatológico de diversos tecidos das mães e da prole em diferentes períodos de seu desenvolvimento;
- a concentração dos metabólitos fecais dos hormônios sexuais das mães em diferentes períodos da gestação e da prole em diferentes períodos de seu desenvolvimento;
- a dosagem de hormônios tireoideanos na prole adulta;
- o comportamento sexual da prole adulta;
- os níveis estriatais e hipotalâmicos de neurotransmissores na prole adulta;
- a capacidade reprodutiva da prole adulta.

Material e métodos

3. *Material e métodos*

3.1 *Animais*

Foram utilizados ratos Wistar adultos, pesando cerca de 180g, de mesma linhagem, obtidos do biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno, com tampa de metal medindo 40 x 50 x 20 cm, por um período não inferior a 5 dias antes de serem colocados nas diferentes situações experimentais. Estas gaiolas foram mantidas em sala com temperatura ambiente aproximadamente constante (23 a 26° C), num ciclo de 12 horas de claro/escuro, sendo a luz acesa às 6:00h. Água e ração foram oferecidas *ad libitum* durante todo o procedimento experimental.

3.2 *Planta*

Os frutos verdes da *S. lycocarpum* foram colhidos (Maio, 2003) em campo na cidade de Itajubá, sul de Minas Gerais. Após reconhecimento pelo Prof. Dr. João Rubens Pirani do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo, exemplares da planta foram depositadas no Herbarium HSF do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo (01-Schwarz).

Os frutos foram coletados e encaminhados o mais breve possível ao Departamento de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP, onde após pesagem prévia (balança BG4000g – Gehaka), foram picados e dessecados em estufa em temperatura inferior a 50°C (SOC. FABBE Ltda.).

Depois de secos os frutos foram encaminhados ao Centro de Pesquisa em Toxicologia Veterinária (CEPTOX) localizado em Pirassununga, onde foram moídos com auxílio de triturador (Nogueira Ltda.) e adicionados à ração moída na proporção de 10% (Balança Toledo – capacidade 3Kg). Após devida homogeneização da ração moída com 10% de frutos moídos, a mistura foi peletizada (peletizadora Rosim®), em temperatura inferior a 50° C, com adição de água em quantidade suficiente a proporcionar umidade máxima de 10%, possibilitando a peletização. Em seguida a ração foi devidamente empacotada em sacos de papelão fechados e encaminhada ao Biotério do Departamento de Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia para futura administração aos ratos do experimento.

3.3 Equipamentos, vidrarias, aparelhos e outros

- Algodão;
- Aparelho de ressonância magnética nuclear Bruker Avance DPX-300;
- Aparelho para avaliação da orientação sexual: consiste de uma arena branca de madeira (94 cm de diâmetro) circundada por parede metálica também branca de 14,5 cm de altura, elevada 60 cm do solo. O chão da arena é dividido, por segmentos de reta, em 32 partes aproximadamente iguais (traçados com tinta preta). Acoplado à arena, em posições dialmetralmente opostas, encontram-se dois compartimentos de madeira fechados (25 x 25 x 14,5 cm) com parede frontal à arena feita de arame, denominados de caixas incentivos;

- Balança BG 4000 g – Gehaka;
- Balança Nohaus® LS2000 g;
- Balança Nohaus® LS200 g;
- Balança semi-analítica Acculab V 1-ng, capacidade 120 g;
- Balança Toledo – capacidade 3 Kg;
- Balão de decantação de 1000 ml (Schott®);
- Balão de vidro de fundo redondo de 1000 ml (Schott®);
- Banho-maria Quimis®;
- Bomba hidráulica KDT®;
- Caixa de madeira cinza medindo 56 x 35 x 31 cm com tampa de madeira móvel em sua parte superior e parede frontal de vidro para avaliação do comportamento sexual;
- Caneta sonicadora LAB LINE® Instruments;
- Capilares de vidro;
- Centrífuga FANEM 206 MP;
- Centrífuga Sorval RCZ-B®;
- Coluna C18 150 x 4,6 mm, com partículas de 5 µm – Supelcosil - Supelco®;
- Coluna de vidro para separação de fases;
- Contador gama (RIE) – Cobra Auto-Gamma Packard
- Desintegrador Nogueira;
- Equipamento de ar comprimido Láctea Ltda;
- Estufa SOC. FABBE Ltda;

- Funil de Buckner Schott®;
- Gaze de algodão;
- HPLC-ED Shimadzu® Modelo 6A;
- Kitassato de 1000 ml Schott®;
- Lâminas de vidro;
- Microscópio óptico de contraste de fase Nikon®;
- Papel de filtro;
- Paquímetro;
- Peletizadora Rosim Ltda;
- Pipeta automática 200 µL Finpippete®;
- Pipeta automática 1000 µl Finpippete®;
- Pipetas Pasteur de vidro;
- Placas de camada delgada com sílica gel 60F-254 (20 cm x 20 cm) Merck®;
- Ponteiros descartáveis para pipetas de 200 e 1000 µl;
- Rotaevaporador Fisatom®;
- Sistema de refrigeração para o rotaevaporador Arsec®;
- Tubos de ensaio de vidro (15 ml);
- Tubos tipo eppendorf de 1,5 ml;
- Vórtex manual Muti-tube VX 2500.

3.4 Drogas e reagentes

- Ácido acético glacial Merck®;

- Ácido diaminoetilenotetracético dissódico (EDTA - Merck®);
- Ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC - Sigma®);
- Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA - Sigma®);
- Ácido heptanossulfônico Merck®;
- Ácido homovanílico (HVA - Sigma®);
- Ácido 3-metóxi-4-hidroxi mandélico (MHPG - Sigma®)
- Ácido perclórico (HClO_4 - Merck®);
- Água ultra pura Milli-Q (Millipore®);
- Álcool iodado;
- Carvão ativo Merck®;
- Clorofórmio p.a. Merck®;
- Dimetil sulfóxido deuterado (DMSO-d_6) Cambridge Isotope Laboratories Inc.
- 17- β -estradiol (Sigma®);
- Etanol comercial 93,6° GL Archote®;
- Etanol p.a. Merck®;
- Éter sulfúrico absoluto Haloquímica®;
- Hidrocloridrato de dopamina (DA - Sigma®);
- Hidrocloridrato de noradrenalina (NOR - Sigma®);
- Hidrocloridrato de serotonina (5-HT - Sigma®);
- Hidróxido de amônio p.a. Merck®;
- Ketamina (Ketamin®);
- Metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ - Merck®);

- Metanol absoluto Synth®;
- Metanol p.a. Merck®;
- Óleo de amêndoas doce;
- Óxido de alumínio ativado (alumina) Merck®;
- Progesterona (Sigma®);
- Reagente de Dragendorff:

iodeto de potássio (12 g)	
água destilada (30 ml)	
nitrato de bismuto (0,51 g)	
ácido acético glacial (30 ml)	
- Sílica 60 F (0,063 a 0,200 mm) Merck®;
- Solução NaCl 0,9%;
- Sulfeto de amônio P.A. Merck®;
- Tampão gelatina (PBS) :

fosfato de sódio dibásico.12H ₂ O - Merck®,	
fosfato de sódio monobásico.1H ₂ O- Merck®,	
azida de sódio e cloreto de sódio - Merck®	
gelatina 4070 - Merck®.	
- Tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃.5H₂O – Merck®);
- Xilazina – cloridrato de dihidroxilatiazina (Rompun®).

3.5 Kits analíticos

- kit comercial DPC – Diagnostic Products Incorporation® para detecção de β -estradiol Coat-a-Count por radioimunoensaio.

- kit comercial DPC – Diagnostic Products Incorporation® para detecção de progesterona Coat-a-Count por radioimunoensaio.
- kit comercial DPC – Diagnostic Products Incorporation® para detecção de testosterona Coat-a-Count por radioimunoensaio.
- kit comercial DPC – Diagnostic Products Incorporation® para detecção de triiodotironina (T4) Coat-a-Count por radioimunoensaio.
- kit comercial DPC – Diagnostic Products Incorporation® para detecção de tiroxina (T3) Coat-a-Count por radioimunoensaio.

Procedimientos

4. Procedimentos

*4.1 Extração e identificação dos alcalóides dos frutos verdes dessecados e moídos da *S. lycocarpum**

Uma alíquota de 100 gramas de frutos verdes dessecados e moídos (conforme descrito no item 3.2), devidamente acondicionada em recipiente de vidro tampado, foi macerada por 96 horas em etanol comercial 93 °GL. O volume de etanol utilizado foi o dobro do volume ocupado pelos frutos moídos no recipiente. Após este período de maceração, o conteúdo líquido (solução hidroalcóolica) obtido foi separado com auxílio de gaze e o resíduo de frutos moídos foi reservado. A solução hidroalcóolica foi filtrada em papel de filtro com auxílio de bomba hidráulica e vácuo. O filtrado obtido foi transferido a um balão de vidro de fundo redondo e submetido a concentração parcial através do emprego de rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura de 50 °C, até eliminação do etanol. Ao resíduo reservado de frutos moídos, foi mais uma vez adicionado, duas vezes o seu volume de etanol 93 °GL. Após maceração por um período de 24 horas, nova filtração e rotaevaporação da solução hidroalcóolica obtida foi realizada como acima descrito, empregando-se na rotaevaporação, o mesmo balão de vidro anterior, por simples adição do filtrado obtido ao primeiro extrato resultante. Este procedimento foi repetido novamente por mais duas vezes, num total de quatro extrações, de acordo com técnica desenvolvida por HARAGUCHI et al., (1978) com modificações.

O material seco resultante, impregnado nas paredes do balão, foi dissolvido com uma solução de ácido acético a 5%. Para dissolução completa do resíduo foram necessários em média 30 mL desta solução ácida. A solução obtida foi transferida para um balão de decantação onde então foi submetida inúmeras vezes a uma partição com 20 ml de éter sulfúrico. Este procedimento só chegou ao fim quando a fase etérea, sempre descartada, mostrou-se bastante clara e límpida, uma vez que o éter sulfúrico foi empregado com o objetivo de purificar esta solução ácida ao retirar os fitopigmentos e gorduras nela presentes. Com auxílio de corrente de ar quente sobre a solução purificada aguardou-se a evaporação completa de qualquer traço de éter. Em seguida foram adicionados 5 ml de hidróxido de amônio. Precipitação intensa dos alcalóides foi então observada. Após centrifugação e descarte do sobrenadante o precipitado obtido foi dissolvido com água destilada e novamente centrifugado.

Ao precipitado limpo resultante adicionou-se 500 ml de solução de álcool etílico a 75% e agitou-se até a obtenção de uma mistura homogênea. Esta solução alcóolica foi então filtrada por coluna de vidro empacotada com duas fases distintas - alumina e mistura de alumina e carvão ativo (camada superior) - previamente umedecida com solução de álcool etílico a 75%. A solução incolor e límpida obtida por gotejamento sucessivo através da coluna foi submetida a rotaevaporação sob pressão reduzida à temperatura de 50 °C até secar completa. Com auxílio de solução de etanol a 75% o material das paredes do balão foi dissolvido e transferido para um recipiente de peso conhecido. Após evaporação de grande parte do solvente por corrente de ar quente o recipiente foi mantido em dessecador até total perda de umidade. A diferença do peso final e

inicial do recipiente indicou o peso de alcalóides totais, que por ter sido obtido a partir de um peso inicial de 100 gramas de frutos, indicou a porcentagem de alcalóides totais presentes na planta. O fluxograma da extração e todas as etapas adotadas estão sucintamente representadas na Figura 3.

Figura 3 – Fluxograma do procedimento adotado para a extração dos glicoalcalóides esteroidais solamargina e solasonina dos frutos verdes dessecados e moídos da *S. lycocarpum*.

*4.2 Isolamento e quantificação dos alcalóides solamargina e solasonina nos frutos verdes dessecados e moídos da *S. lycocarpum**

Uma pequena porção da fração de alcalóides totais, obtida conforme acima descrito, foi transferida para um recipiente e dissolvida com pequeno volume de solução de etanol a 80%. Padrões de solasonina e solamargina, gentilmente cedidos pela Dra. Mitsue Haraguchi do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais do Instituto Biológico-SP, foram separadamente dissolvidos no mesmo solvente. Em seguida realizou-se uma corrida cromatográfica em camada delgada (CCD) (Figura 3), para verificar a presença ou não destes alcalóides na amostra. A fase estacionária foi constituída por placa (20 cm x 20 cm) com sílica gel 60F-254 (Merck®) e a fase móvel foi constituída pelo sistema clorofórmio: metanol: hidróxido de amônio (2:2:1). Após corrida da fase móvel pela placa, esta foi revelada com o reagente de Dragendorff, específico para substâncias nitrogenadas, como alcalóides.

Certificada a presença dos alcalóides na amostra, uma pequena quantidade desta, 100 mg, foi dissolvida com pequeno volume de etanol 80% e transferida para uma coluna de separação (100 cm) empacotada com sílica gel 60G (diâmetro: 0,063 a 0,200 mm - Merck®). Para retirada do ar da coluna, a mesma foi previamente tratada com o sistema etanol:clorofórmio (1:1). Em seguida, cerca de 400 ml desta solução foi aos poucos adicionada à alíquota amostral dissolvida, e várias frações foram sendo vagarosamente coletadas, em pequenos frascos enumerados, pela outra extremidade da coluna. Foram coletadas 60 frações que, após evaporação total do solvente por corrente de ar quente (em temperatura

inferior a 30° C), foram uma a uma ressuspensas com pequeno volume de solução alcóolica a 80%, aplicadas em placas de camada delgada as quais, por sua vez, foram transferidas à uma cuba saturada com o sistema solvente clorofórmio : metanol : hidróxido de amônio (2:2:1) até corrida do solvente pela placa e revelados com Dragendorff. Em seguida, as porções com os alcalóides isolados, revelados pelo Dragendorff, foram reunidas em dois frascos de peso conhecido: as porções em que se revelou mancha com mesmo R_f (calculado através da multiplicação $R_f \times 100$, onde R_f = razão entre a distância da mancha obtida e a distância percorrida pelo sistema móvel na placa, equivalente ao tempo de retenção) da solamargina foram reunidas em um dos frascos e as porções em que se revelou mancha com mesmo R_f da solasonina foram reunidas no outro frasco. Após evaporação total do solvente por corrente de ar quente, os dois frascos foram mantidos em dessecador para certificação de perda completa da umidade e novamente pesados. A diferença entre os pesos inicial e final indicou aproximadamente a quantidade individual destes alcalóides na fração de alcalóides brutos. O procedimento acima, de isolamento e quantificação dos glicoalcalóides esteroidais solamargina e solasonina, está demonstrado no fluxograma da Figura 4.

O conteúdo dos dois frascos foram então homogeneizados em dimetil sulfóxido deuterado ($DMSO-d_6$). As soluções obtidas foram analisadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (300 MHz) e de carbono¹³ (100 MHz) no Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Figura 4 – Fluxograma com o procedimento de isolamento e quantificação dos glicoalcalóides esteroidais solamargina e solasonina.

(EtOH= etanol; CHCl₃= clorofórmio; MeOH= metanol; NH₄OH= hidróxido de amônio)

4.3 Preparo da ração com 10% de frutos verdes da *Solanum lycocarpum*

Os frutos verdes da planta, uma vez picados e dessecados em estufa (SOC.FABBE Ltda.) a 50 °C, foram moídos (desintegrador Nogueira Ltda.) e o pó obtido devidamente acondicionado em invólucros de papel, isentos da ação de umidade e luminosidade. Este pó foi adicionado à ração moída na proporção de 10%. A mistura foi então cuidadosamente homogeneizada e peletizada

(peletizadora Rosim Ltda.). Após o preparo, a ração foi devidamente acondicionada em grandes sacos de papelão, vedadas e transportadas em condições secas, com temperatura não superior a 35 °C, ao Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, onde ficou devidamente armazenada até o momento em que seria oferecida *ad libitum* às ratas prenhes no período que compreende o 6º dia da gestação ao 7º dia da lactação.

4.4 Diagnóstico de prenhez

Fêmeas adultas (entre 75 e 90 dias de vida) nulíparas, sabidamente na fase do estro, condição constatada por observação microscópica de células queratinizadas sem presença de leucócitos nem células nucleadas no lavado vaginal, foram mantidas na mesma gaiola de machos comprovadamente férteis, na proporção de duas fêmeas para cada macho, durante o período escuro do ciclo de luz. Na manhã do dia seguinte, por outro lavado vaginal realizado pelo mesmo procedimento, ou seja, com auxílio de pipeta automática de 200 µL, solução salina (NaCl) 0,9%, lâminas de vidro e microscópio óptico, a prenhez foi confirmada pela presença de espermatozóides nas lâminas, indicando o primeiro dia da gestação. Durante toda a gestação as fêmeas foram mantidas em gaiolas individuais. Neste período e também durante a lactação, avaliou-se o consumo de ração, a ingestão hídrica, o peso e, a partir deste último parâmetro, o ganho de peso das fêmeas.

4.5 Avaliação da toxicidade materna

A toxicidade materna foi avaliada pela observação diária, durante a gestação, do peso, ingestão hídrica e consumo de ração. O ganho de peso foi avaliado nos intervalos de dias 01 a 06 da gestação (DG 01-06), DG 06-10, DG 10-14, DG 14-18, DG 18-22 e DG 01-22. No período que compreende a lactação, foram mensurados o peso nos dias pós-natal (PN) 01, PN 07, PN 14 e PN 21 e o ganho de peso das mães nos períodos PN 01-07, PN 07-14, PN 14-21 e PN 01-21.

4.6 Desempenho reprodutivo e avaliação perinatal

Logo ao nascimento (PN 01) cada ninhada foi minuciosamente observada sendo registrados peso de cada ninhada, número total de filhotes, número de filhotes machos e fêmeas, número de filhotes mortos e possíveis alterações físicas. A seguir, procurou-se padronizar as ninhadas em quatro fêmeas e quatro machos, sendo os demais sacrificados após detalhada análise de possíveis malformações.

Com o auxílio de um paquímetro mediu-se o comprimento corporal e a distância anogenital de cada filhote, visando confirmar o sexo. Os dados da distância anogenital foram transformados na razão entre a distância anogenital (mm) e a raiz cúbica do peso corporal do filhote no dia PN 01, com o objetivo de melhor verificar possíveis variações (GALLAVAN et al., 1999). Periodicamente, nos dias PN 01, PN 04, PN 07, PN 10, PN 14, PN 17, PN 21, PN 30, PN 60, PN 75 e PN 90, anotou-se o peso de um filhote macho e de uma fêmea por ninhada, marcados previamente com caneta esferográfica atóxica colorida. O ganho de

peso foi então calculado nos intervalos que compreendem os dias PN 01-07, PN 07-14, PN 14-21, PN 21-30, PN 30-60, PN 60-75, PN 75-90 e PN 01-90.

Durante a observação sempre se empregou delicadeza no manuseio e cuidado ao lavar as mãos, passá-las pela maravalha da gaiola e em seguida pela ração antes de se manusear os filhotes. Os parâmetros descida de testículos e abertura vaginal foram acompanhados e o dia de seu aparecimento registrados.

4.7 Acompanhamento do ciclo estral

O ciclo estral foi acompanhado através de observações microscópicas diárias do lavado vaginal. Os lavados foram realizados sempre pela manhã, sendo obtidos pela introdução e aspiração de solução de NaCl 0,9% na vagina das ratas, com o auxílio de uma pipeta automática (200 μ L) com ponteiros plásticos descartáveis. O lavado obtido foi colocado em lâmina de vidro para observação em microscópio óptico. Foi considerado indicativo da fase de diestro a existência de grande quantidade de leucócitos, com ou sem a presença de muco, no material examinado; o proestro foi indicado pela presença de muitas células epiteliais nucleadas; a presença abundante de células queratinizadas indicou a fase de estro; e, finalmente, a predominância de células queratinizadas e de leucócitos no esfregaço, foi tomada como indicativo do metaestro.

O acompanhamento do ciclo estral foi realizado nas proles fêmeas (n=8 por grupo) em idade adulta durante 21 dias, com o intuito de se constatar possíveis anormalidades, e também nas mães, logo no início do experimento, quando foram

mantidas para acasalar com machos férteis enquanto nas fases de proestro ou estro do ciclo.

4.8 Análise do peso úmido e estudo histopatológico de órgãos acessórios dos aparelhos reprodutivos masculino e feminino e outros órgãos diversos

No desmame (PN 21) as mães foram eutanasiadas e tomado o peso úmido (g) do útero, ovários, fígado, rim, adrenal, pulmão, coração, timo, baço e pâncreas. Porções destes órgãos, após serem fixados em formol 10%, foram processados para a confecção de lâminas que, coradas com eosina-hematoxilina (HE), possibilitaram o estudo histopatológico dos diferentes tecidos. O mesmo foi realizado com porções teciduais de cinco fêmeas e cinco machos, obtidos de proles distintas, ao nascimento (PN 01) e ao completarem PN 07, PN 14, PN 21, PN 30, PN 60 e PN 90. Nos machos tomou-se o peso e consequente análise dos testículos, epidídimos e vesícula seminal, além dos demais órgãos acima citados. Em seguida, a razão entre o peso de cada órgão pelo peso corporal foi calculada.

4.9 Ovariectomia das fêmeas

Este procedimento foi realizado para a obtenção de ratas iscas (sexualmente maduras que não passaram por nenhum tipo de procedimento experimental) necessárias para a avaliação do comportamento sexual de ratos machos e realizado também em ratas do experimento (controle e experimentais) para a avaliação do comportamento sexual das mesmas.

Aos PN 70, as ratas foram anestesiadas com associação de cetamina (Ketamin®) e xilazina (Rompun®). Após depilação prévia da área dos flancos com lâmina de barbear acoplado a suporte de bisturi, desinfecção com álcool iodado e incisão na região lateral dos flancos, os ovários foram exteriorizados, um por vez. Nos ovários ainda intactos fez-se sutura dos ligamentos meso-ovarianos com linha de algodão asséptica, e, só depois de devidamente suturado, fez-se a extração dos mesmos com bisturi. Por fim, após fechamento dos tecidos internos e externos por pontos separados, as fêmeas foram mantidas em local aquecido por pelo menos três horas e em seguida encaminhadas à sala de ciclo de luz invertido do biotério, onde permaneceram alojadas. Após 21 dias da cirurgia, período necessário para a total eliminação dos hormônios sexuais e de seus metabólitos (FELÍCIO et al., 1989), as ratas já se encontravam aptas para a realização dos testes.

4.10 Avaliação do comportamento sexual

Para o comportamento sexual de fêmeas e machos e para o estudo da orientação sexual, os ratos foram primeiramente acondicionados por um período mínimo de três semanas em sala de ciclo invertido de luz (das 10 às 22 horas correspondendo à fase escura).

4.10.1 Orientação sexual de machos

Um aparelho inicialmente proposto por HETTA e MEYERSON (1978), posteriormente modificado por DAHLGREN et al. (1991), foi aqui empregado. O

aparelho constitui de uma arena esférica de madeira pintada na cor branca com 94 cm de diâmetro, circundada por parede metálica de 14,5 cm de altura também pintado na cor branca, elevada 60 cm do solo. Em posições diametralmente opostas da arena encontram-se acoplados a ela dois compartimentos de madeira fechados, sendo que a parede frontal à arena é de arame, possibilitando uma certa interação entre os animais, denominados de caixas incentivo. O chão da arena é dividido, por segmentos de reta, em 32 partes aproximadamente iguais: as duas partes próximas das caixas incentivo são denominadas de área I; as 6 partes subsequentes são pintadas de cinza e são denominadas de área II; e finalmente as 16 partes localizadas na região central da arena são denominadas de área indiferente, conforme demonstrado na Figura 5.

Figura 5 – Arena empregada para a mensuração da orientação sexual de ratos machos adultos (PN100).

Em um dos compartimentos manteve-se, no momento do teste, uma rata “isca” ovariectomizada com estro induzido por administração subcutânea de 17- β -estradiol (50 μ g/kg) 54 horas antes do teste e de progesterona (2 mg/kg) 06 horas antes do teste. No outro compartimento foi mantido um rato macho isca adulto em fase reprodutiva.

As observações foram realizadas entre 14 e 18 horas, na fase escura do ciclo, com os ratos experimentais individualmente mantidos livres na arena, durante 20 minutos. Com auxílio de cronômetros, registrou-se o tempo de permanência de cada animal nas 5 subdivisões feitas do agrupamento dos quadrados da arena: área MI (área justaposta à parede de arame que separa o compartimento em que está o macho isca da arena), MII (área próxima do compartimento em que se encontra o macho isca, FI (área justaposta à parede de arame que separa o compartimento em que está a fêmea isca da arena), FII (área próxima do compartimento em que se encontra a fêmea isca) e área indiferente, que corresponde a área central da arena. O objetivo foi verificar qual a preferência do macho experimental: ficar mais próximo da fêmea com o estro induzido ou ficar mais próximo do macho isca.

4.10.2 Comportamento sexual de fêmeas

A prole fêmea, em fase adulta, foi previamente ovariectomizada conforme descrito no item 4.9 e mantida em ciclo invertido por um período mínimo de três semanas. Em seguida as ratas receberam, subcutaneamente, 50 μ g/kg de 17- β -estradiol e 2,0 mg/kg de progesterona, 54 e 06 horas antes do início dos testes, respectivamente. No momento do teste as ratas foram individualmente colocadas

em uma caixa de madeira (56 x 35 x 31cm) pintada na cor cinza com tampa superior móvel e parede frontal de vidro forrada internamente com maravalha, já com um macho “isca” experiente a pelo menos 5 minutos em seu interior. Observou-se a presença ou não de lordose nas fêmeas em dez montas realizadas pelo macho. Definiu-se lordose como o ato da fêmea curvar o dorso para baixo expondo a genitália, permitindo desta forma a intromissão do pênis. Cada fêmea foi testada uma única vez. Com esses dados calculou-se o coeficiente de lordose, $CL (\%) = \text{n}^\circ \text{ de lordoses} / \text{n}^\circ \text{ de montas} \times 100$, conforme proposto por BEACH (1967).

4.10.3 Comportamento sexual de machos

O procedimento para a quantificação do comportamento sexual dos ratos machos foi baseado no descrito por AHLENIUS e LARSSON (1984). Cada rato foi colocado na caixa de observações (a mesma utilizada para as fêmeas) 5 minutos antes da rata “isca” previamente ovariectomizada (item 4.9) com o estro induzido, a fim de adaptá-lo ao novo ambiente. Colocada a fêmea, registrou-se por meio de cronômetros os seguintes parâmetros comportamentais dentro de um período de 40 minutos:

- a) presença ou não de monta nos dez minutos subsequentes;
- b) presença ou não de ejaculação nos 40 minutos subsequentes;
- c) latência para a primeira monta;
- d) latência para a primeira intromissão;
- e) latência para a primeira ejaculação;

- f) número de montas realizadas até a primeira ejaculação;
- g) número de intromissões até constatação da primeira ejaculação;
- h) latência para a realização da primeira monta após a ejaculação;
- i) número total de montas em 40 minutos;
- j) número total de intromissões em 40 minutos;
- k) número total de ejaculações em 40 minutos.

O número total de montas foi calculado pela soma das montas incompletas (sem intromissão peniana) e o número de intromissões. As latências foram registradas em segundos. Com a obtenção destes resultados, registrou-se a frequência de montas completas, a frequência de montas incompletas e a frequência de intromissões.

O comportamento sexual dos ratos é avaliado pela determinação dos componentes libido e potência (BITRAN e HULL, 1987). A libido (motivação sexual) foi mensurada através das latências para a realização de montas e intromissões, sendo que o aumento das latências indica menor motivação. A potência sexual foi avaliada pela eficiência copulatória, ou seja, pelo número de intromissões que precedem a ejaculação (MALMNAS, 1973), ou pelo número de ejaculações em um determinado tempo. Assim, o aumento do número de intromissões pode sugerir prejuízos no comportamento sexual. O índice neuromotor foi avaliado através do número de intromissões e latência para a ejaculação. O índice neuromotor e o índice de atividade sexual foram calculados conforme descrito por AGMO (1997). A partir destes componentes foram calculados:

a) Eficiência copulatória (EC):

$$EC = (NI/TM) \times 100$$

Onde: NI= número de intromissões

TM= número total de montas (montas incompletas + intromissões)

b) Índice de atividade sexual (IAS):

$$IAS = \log[(1/LPM) \times 40] + \log[(1/LPI) \times 40] + \log[(1/LE) \times 40] + \sqrt{TM} + Y$$

Onde: LPM= latência para a primeira monta

LPI= latência para a primeira intromissão

LE= latência para a primeira ejaculação

TM= nº total de montas (montas incompletas + intromissões).

Y=4 quando da ocorrência e 0 quando da ausência de ejaculação.

c) Frequência de montas (FM): número de montas incompletas dividido pelo tempo entre a primeira monta e a primeira ejaculação, multiplicado por 100.

d) Frequência de intromissões (FI): número de intromissões dividido pela latência para a primeira ejaculação, multiplicado por 100.

e) Índice neuromotor (INM):

$$INM = NI/(LE-LPI)$$

Onde: NI= número de intromissões

LPI= latência para a primeira intromissão

LE= latência para a primeira ejaculação

4.11 Estudo da fertilidade das proles

Os pontos de reabsorção e de implantação foram observados através da técnica de coloração dos cornos uterinos com o reativo de Salewski (SALEWSKI, 1964), que consiste em uma preparação de 40% de sulfeto de amônio (sulfeto de amônio P.A.-Merck®) e 60% de água destilada. Esta solução permite a

visualização das implantações e das reabsorções em estágios iniciais de implantação.

4.11.1 Em fêmeas

A prole fêmea, quando adulta (PN 100), foi mantida em gaiolas individuais com ratos machos comprovadamente férteis. Em cada gaiola permaneceu uma fêmea e um macho. Diariamente, por um período máximo de 15 dias, foram coletadas células da mucosa vaginal para observação ao microscópio. A presença de espermatozóides na lâmina de esfregaço vaginal foi o indicativo do primeiro dia da gestação (DG 01). Os machos foram mantidos nas gaiolas por 15 dias ou até que todas as fêmeas acasalassem. No 22º dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas com éter etílico e mortas por meio de secção da medula espinhal e dos grandes vasos cervicais. Em seguida, foram posicionadas em decúbito dorsal para incisão longitudinal na parede abdominal e posterior visualização dos cornos uterinos. Os cornos uterinos foram expostos para observação e contagem do número de implantações (fetos vivos, mortos e sítios de reabsorção). Os ovários foram isolados, e com auxílio de uma lupa, os corpos lúteos foram separados e contados. A partir da contagem das implantações, corpos lúteos e fetos vivos, foram obtidos os seguintes parâmetros:

$$\text{a) Taxa de perda pré-implantação} = \frac{\text{nº de corpos lúteos} - \text{nº de implantações}}{\text{nº de corpos lúteos}} \times 100$$

$$\text{b) Taxa de perda pós-implantação} = \frac{\text{nº de implantações} - \text{nº de fetos vivos}}{\text{nº de implantações}} \times 100$$

c) Taxa de implantação = (nº de implantações / nº de corpos lúteos) x 100

d) % fetos vivos = (nº de fetos vivos / nº de implantações) x 100

4.11.2 Em machos

Os machos, quando adultos (PN 100), foram mantidos para acasalar, por até 15 dias consecutivos, com fêmeas adultas, virgens, ciclando normalmente. Cada macho foi mantido em uma gaiola coletiva com 4 fêmeas. Na manhã do dia seguinte, e diariamente até o 15º dia, foram coletadas células da mucosa vaginal das fêmeas, pelo mesmo procedimento utilizado no item anterior. O material foi observado ao microscópio óptico. A presença de espermatozóides foi indicativo do primeiro dia de gestação (DG 01) da fêmea. Após a fecundação das quatro fêmeas, o macho foi retirado da gaiola. No 22º dia da prenhez, as fêmeas foram eutanasiadas conforme descrito no item anterior. Cuidadosamente se observou os cornos uterinos e os ovários, o número de implantações e de corpos lúteos. Assim, determinou-se as taxas de perdas pré e pós implantação, taxa de implantação e porcentagem de fetos vivos, seguindo a mesma metodologia descrita no item anterior.

4.12 Avaliação dos níveis de metabólitos de hormônios sexuais em fezes de ratos e dos níveis séricos de hormônios tireoideanos na prole adulta

4.12.1 Colheita e armazenamento do material fecal

A função ovariana das mães foi verificada a partir da colheita de fezes no 22º dia da gestação e nos dias PN 01, PN 07 e PN 21. Para o monitoramento não invasivo da função ovariana na prole feminina e da função testicular na prole masculina, foram colhidas amostras fecais aos 30, 60 e 90 dias de vida pós-natal. Cada amostra colhida foi acondicionada em recipiente de polipropileno com tampa resistente à baixas temperaturas. As amostras foram devidamente identificadas quanto ao número do animal, grupo a que pertence e datas de colheita, e armazenadas em freezer a - 80 °C até o momento de seu transporte para o Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia –USP, onde foram realizados os processos de extração e dosagem hormonal por radioimunoensaio (RIE).

4.12.2 Colheita e armazenamento do soro

Os filhotes fêmeas e machos ao completarem 90 dias de vida foram decapitados e seu sangue coletado em tubos de vidro. As amostras coletadas, após repouso (3 a 4 horas) em temperatura ambiente, foram centrifugadas por 7 minutos. Em seguida o soro obtido foi separado e acondicionado em tubos de polipropileno tipo ependorff devidamente marcados. As amostras foram mantidas em freezer a - 80 °C até o momento da análise, realizada por RIE.

4.12.3 Processamento das amostras fecais

Utilizou-se de técnica desenvolvida para a extração de metabólitos dos hormônios sexuais das fezes de felinos, com algumas modificações (BROWN et al. 1994; BROWN et al. 1996; BROWN et al., 1997).

Em tubos de ensaio de vidro (15 ml), devidamente identificados, foram colocadas alíquotas de 0,25 g a 0,30 g de fezes, sobre as quais foram adicionadas 5 ml de etanol (Etanol p.a., Merck®) a 90 % (90 % etanol : 10 % água destilada). Em seguida os tubos foram mantidos em banho-maria a 90 °C (Quimis®) por 25 minutos, após iniciada a fervura da solução. Durante esse tempo o etanol evaporado foi gradativamente repostado para que nenhuma amostra apresentasse volume inferior a 5 ml. Assim, após a fervura, o volume final de cada tubo continuou sendo de 5 ml. O material foi homogeneizado em aparelho vortex (Multi-tube VX 2500) e a seguir centrifugado a 500 g por 15 minutos (FANEM 206 MP). Ao final, o sobrenadante foi transferido para tubos limpos. O precipitado resultante desta primeira centrifugação foi novamente homogeneizado em 5 ml de etanol 90%, sendo agitado por 30 segundos e centrifugado por 15 minutos. Os dois sobrenadantes foram então reunidos num único tubo e secos por completo em fluxo (LACTEA Ltda.) sob ar comprimido (MSI 5,2 ML/100). O extrato seco resultante foi reconstituído em 1 ml de metanol (Metanol p.a., Merck®), através de agitação no aparelho vortex (Multi-tube VX 2500) por 5 minutos. Esse extrato em seguida foi armazenado em freezer (-20 °C) onde permaneceu até a etapa de dosagem hormonal.

No dia da análise, as amostras foram diluídas em tampão gelatina. Para a dosagem dos níveis de estrógenos, progestágenos e andrógenos nas fezes das

fêmeas, foram preparadas diluições 1:20 partindo da adição de 950 µl de tampão em 50 µl do extrato metanólico de fezes. Para a dosagem dos níveis de estrogênios e progestágenos nas fezes dos machos, também foram preparadas diluições 1:20, conforme acima descrito. Já para a dosagem dos metabólitos fecais da testosterona em machos, partiu-se de uma diluição 1:4 onde 750 µl de tampão foram adicionados à 250 µl de extrato metanólico de fezes.

4.12.4 Dosagens hormonais

Para a dosagem dos metabólitos fecais dos hormônios β -estradiol, progesterona e testosterona, e para a dosagem sérica dos hormônios tireoideanos T3 e T4, utilizou-se da técnica de RIE em fase sólida, por meio de conjunto diagnóstico comercial (kits comerciais DPC – Diagnostics Products Corporation®) desenvolvido para avaliação quantitativa de progesterona (P_4), estradiol (E_2), testosterona (T), triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) em soro humano.

No RIE em fase sólida a quantificação do antígeno é feita através da competição de formas radioativas e não radioativas de cada hormônio, no caso de dosagens fecais, dos metabólitos de cada hormônio. Estes vão competir entre si pelos sítios de ligação livres no anticorpo específico. Neste sistema o anticorpo está ligado à parede interna dos tubos de polipropileno. O complexo antígeno-anticorpo permanece ligado a parede do tubo, e o antígeno livre é decantado ou evaporado. Os tubos são levados a um contador gamma para a determinação da quantidade de antígeno [I^{125}] ligado ao anticorpo. A quantidade de radiação

detectada é inversamente proporcional à concentração do hormônio, que é por sua vez determinada através da curva padrão fornecida pelo kit comercial.

Os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos dos fornecedores e os seguintes parâmetros de controle de qualidade (CQ) foram analisados em cada kit: contagem por minuto (CPM) total, capacidade de ligação (CL), ligações não específicas (LNE), sensibilidade e coeficientes de variação (CV) intra-ensaio alto e baixo para cada um dos ensaios realizados. Foram realizados dois ensaios para progesterona e estradiol, uma vez que algumas amostras foram mensuradas duas vezes, em busca de melhor diluição e melhores resultados. Por este motivo, nestes dois kits, o CV inter-ensaio também foi analisado. O desempenho dos ensaios realizados estão demonstrados no quadro abaixo:

Quadro 1: Parâmetros de controle de qualidade analisados nos kits de hormônios tireoideanos e sexuais.

Parâmetros	Triiodotironina	Tiroxina	Testosterona	Progesterona		Estradiol	
	Ensaio único	Ensaio único	Ensaio único	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 1	Ensaio 2
CPM total	18190,0	24515,5	16482,3	27573,8	25556,8	13420,8	12479,3
CL (%)	37	29	59	52	52	46	45
LNE (%)	0,66	0,49	0,89	0,43	0,42	0,97	0,74
Sensibilidade -	95,0	91,8	88,1	95,6	94,4	93,3	94,5
(% dose)	2,05	0,05	0,8	0,02	0,03	2,43	1,64
CVintra alto(%)	5,38	5,33	4,29	4,15	1,07	3,64	1,15
CVintra baixo (%)	2,54	12,86	9,65	3,04	4,32	7,96	3,53
CVinter alto(%)	—	—	—	2,72		1,41	
CVinter baixo (%)	—	—	—	0,28		2,45	

CPM= contagem por minuto, CL= capacidade de ligação, LNE= ligações não específicas, CV = coeficientes de variação.

4.12.5 Validação dos kits para as dosagens fecais

Para a validação dos conjuntos diagnósticos comerciais DPC MEDLAB® usados em extrato de fezes de ratos machos e fêmeas, foi usado o método do paralelismo utilizando matriz depletada, que indica se os hormônios da espécie estudada estão interagindo com o anticorpo do conjunto diagnóstico de forma similar ao hormônio usado como padrão. Foi realizada a depleção hormonal de um “pool” de amostras com uma solução de carvão-dextran (DARBRE et al., 1983; REDDEL et al., 1984). A essa matriz depletada adicionou-se valores conhecidos do hormônio padrão, com diluições que se aproximavam dos pontos da curva do conjunto diagnóstico. Com esta diluição construiu-se uma curva correlacionando (fator de correlação de linearidade = R^2) estes valores.

4.12.6 Níveis dos metabólitos dos hormônios sexuais em diferentes períodos da gestação de ratos

A validação fisiológica foi realizada no período que compreende a gestação. Para tanto comparou-se as menores e maiores concentrações de estrógenos, progestinas e andrógenos fecais obtidas de ratas prenhes de nosso biotério (n=6), não experimentais, nos dias 01, 07, 14 e 21 da gestação.

4.12.7 Transformação das concentrações fecais determinadas por RIE

As concentrações determinadas primariamente por RIE foram expressas para progesterona em ng/ml, para estradiol em pg/ml e para testosterona em ng/dl. Os resultados obtidos foram transformados pela seguinte equação:

$$CF = [(C \times V_f \times D \times 1) / P_i] \times 1000$$

Onde: CF= concentração final
C= concentração fornecida pelo RIE
V_f= volume da solução de fezes ao final da etapa de extração (ml)
D= diluição empregada
P_i= peso inicial das fezes (g)

Após transformação dos valores pela fórmula, estes ainda tiveram suas unidades convertidas para facilitar a observação dos mesmos em tabelas e gráficos. Para tanto, os dados referentes à progesterona e estradiol foram convertidos para ng/g e os dados referentes à testosterona foram convertidos para µg/g.

4.13 Dosagem dos níveis cerebrais de DA, HVA, DOPAC, MHPG, VMA, 5-HT e 5-HIAA

4.13.1 Procedimentos para a obtenção de amostras de homogenatos cerebrais

Para a realização das dosagens neuroquímicas os animais foram decapitados no período da manhã (9:00-11:00 hs), retirados seus encéfalos do crânio e imediatamente lavados em solução salina 0,9% gelada. Em seguida, o cérebro foi dissecado sobre placa de gelo, rodeado por gelo seco. O estriato direito e o hipotálamo foram retirados, pesados e imediatamente congelados (-80 °C) num período máximo de 3 minutos por animal. Os tecidos foram então homogeneizados com caneta sonicadora (LAB LINE® Instruments) sob

refrigeração com gelo, em ácido perclórico 0,01M, contendo 0,02% de metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ – Merck®) e 0,02% de ácido diaminoetilenotetracético dissódico (EDTA – Merck®), na proporção de 10 μl para cada miligrama de tecido. Os homogenatos obtidos foram conservados em geladeira por 24 horas para a precipitação de proteínas e ácidos nucleicos, interferentes das amostras. Em seguida, o material foi centrifugado a 11.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado, devidamente acondicionado em tubo de polipropileno e mantido em freezer -80 °C até o momento da análise.

4.13.2 Condições cromatográficas

Foi empregada a cromatografia em fase reversa. As condições do sistema foram: sistema isocrático com fluxo constante de 0,8 ml/min, temperatura de 65 °C, tempo de corrida de 18 minutos, detector com potencial mantido a +0,83V no eletrodo de trabalho. A coluna empregada foi a C-18 (150 x 4,6 mm com partículas de 5 μm – Supelcosil, Supelco®). A fase móvel utilizada foi constituída por 0,55 g/L de ácido heptanossulfônico, 7,16 g/L de $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 4,20 g/L de ácido cítrico, 0,04 g/L de EDTA dissódico, 80 ml/L de metanol e água Milli-Q para completar o volume de 1000ml. O pH foi ajustado para 3,1 com ácido ortofosfórico. A fase móvel foi filtrada com membranas milipore de 0,22 μm em sistema à vácuo e deaerada por 30 minutos com fluxo constante de hélio. Em seguida a fase móvel circulou em sistema cromatográfico fechado por 18 horas para estabilização da coluna e da linha de base, operando em fluxo constante de 1,0 ml/min. A caracterização das diferentes substâncias analisadas se deu pelo tempo de

retenção, reflexo da polaridade destes compostos. Desta forma, substâncias mais polares se retêm menos na sílica da coluna, apresentando um tempo de retenção menor.

4.13.3 Preparo das soluções padrões de monoaminas

Os padrões de concentrações de 1 mM de NOR, DA, DOPAC, HVA, 5-HIAA e 5-HT foram diluídos em solução de ácido clorídrico 0,1M contendo 0,02% de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, distribuídos em tubos de polipropileno de 1,5 ml e em seguida congelados em freezer à -80 °C por período não superior a 2 meses. No momento da análise os padrões foram descongelados, diluídos 10.000 vezes com solução de ácido perclórico 0,01M. Os padrões foram injetados todos os dias antes do início das corridas analíticas, intercaladamente e ao final das dosagens. A curva de calibração foi obtida com o auxílio de 3 concentrações diferentes de padrão, sendo, em seguida, os cálculos realizados em planilha Excel, onde a altura dos picos dos cromatogramas obtidos foi dividida pela concentração respectiva desses padrões. Com o conjunto de fatores, foi calculada a média, e este valor médio foi empregado para o cálculo das concentrações de neurotransmissores e metabólitos nas amostras.

Delineamento experimental

5. *Delineamento experimental*

Para a realização dos diversos testes, foram utilizados inicialmente 50 ratas adultas, virgens e nulíparas. Todas foram mantidas em gaiolas com machos sabidamente férteis e experientes sexualmente, para o acasalamento. Deste grupo de ratas 46 ficaram prenhes. 21 ratas prenhes foram aleatoriamente separadas e constituíram o grupo controle e as 25 restantes constituíram o grupo experimental. As ninhadas resultantes apresentaram número suficiente de filhotes para a realização dos diversos testes que foram praticados em diferentes momentos da vida das proles.

5.1 *Avaliação da toxicidade materna*

Foram utilizadas 21 ratas controle e 25 ratas experimentais. Todas foram mantidas em gaiolas individuais após a constatação da prenhez. As ratas experimentais receberam, do 6^o dia de gestação ao 7^o dia de lactação, ração com 10% de frutos da *S. lycocarpum* preparada como anteriormente descrito, e as ratas do grupo controle receberam ração comercial comum. Água e ração foram oferecidos *ad libitum* para ambos os grupos. Durante este período registrou-se o peso, a ingestão hídrica e o consumo de ração das mães nos dias DG 01, DG 06, DG 10, DG 14, DG 18 e DG 21. O ganho de peso das mães foi calculado a partir do peso nos intervalos de DG 02-06, DG 06-10, DG 10-14, DG 14-18, DG 18-22 e DG 01-22 dias. O período de lactação, que compreende o período entre o dia de nascimento (PN 01) e o dia PN 21, também foi avaliado a partir dos mesmos

parâmetros, sendo que o peso, a ingestão hídrica e o consumo de ração foram registrados nos dias PN 01, PN 07, PN 14 e PN 21, e o ganho de peso nos intervalos entre os dias PN 01-07, PN 07-14, PN 14-21 e PN 01-21.

5.2 Desempenho reprodutivo e avaliação perinatal

Ao nascimento (PN 01) os parâmetros relacionados com o desempenho reprodutivo, descritos no item 4.6: duração de prenhez (em dias), número total de filhotes, número de filhotes fêmeas, número de filhotes machos, número de natimortos, proporção entre o número de filhotes machos e de fêmeas por ninhada, comprimento corpóreo e distância anogenital no dia PN 01, dia da descida dos testículos e da abertura vaginal e peso das ninhadas, foram avaliados. Além destes parâmetros, uma fêmea e um macho por ninhada foram marcados com caneta esferográfica colorida e constantemente monitorados quanto ao peso (nos dias PN 01, PN 04, PN 07, PN 10, PN 14, PN 17, PN 21, PN 30, PN 60, PN 75 e PN 90) e ganho de peso (no intervalo de dias PN 01-07, PN 07-14, PN 14-21, PN 21-30, PN 30-60, PN 60-75, PN 75-90, PN 01-90).

5.3 Análise do peso úmido e estudo histopatológico de órgãos

No dia do desmame (PN 21), após coleta de fezes (07 amostras por grupo) para posterior dosagem de metabólitos de hormônios esteroidais, as mães foram sacrificadas para análise do peso úmido (n=15 por grupo) dos seguintes órgãos: ovários direito e esquerdo, útero, baço, pâncreas, adrenal, rim, coração, timo, pulmão e fígado. O mesmo foi realizado em um macho (n=10 por grupo) e uma

fêmea (n=10 por grupo) de ninhadas distintas ao completarem 07, 14, 21, 30, 60 e 90 dias de vida, sendo que nos machos fez-se a observação do peso úmido dos seguintes órgãos acessórios do aparelho reprodutor: testículos direito e esquerdo, vesícula seminal e nos dias PN 21, 30, 60 e 90 também análise dos epidídimos direito e esquerdo. Em seguida calculou-se a razão do peso do órgão pelo peso corporal.

Logo após a mensuração do peso, porções destes órgãos (n=5 por grupo) foram coletados e mantidos em solução de formol à 10%. Cada amostra foi submersa em parafina. Os blocos sólidos resultantes foram devidamente cortados, fixados em lâmina e corados com hematoxilina eosina.

5.4 Avaliação do comportamento sexual

Para a orientação sexual foram utilizados 12 machos controle e 12 machos experimentais com 90 dias de vida, obtidos de ninhadas distintas. Fêmeas e machos “iscas” em idade reprodutiva foram empregados conforme já descrito no item 4.10.1. Com auxílio de cronômetros e da arena esférica subdividida avaliou-se a preferência sexual dos animais.

Para o comportamento sexual das fêmeas foram empregadas 10 fêmeas do grupo controle e 11 fêmeas do grupo experimental, obtidas de ninhadas distintas. Ao completarem pelo menos 70 dias de vida (PN 70) as fêmeas foram ovariectomizadas conforme item 3.9 e transferidas para uma sala de ciclo de luz invertido. Após 21 dias de repouso e permanência nesta nova condição, ou seja, logo ao completarem 90 dias de vida (PN 90), avaliou-se o comportamento sexual

das fêmeas, após indução artificial do estro por injeção subcutânea de 17- β -estradiol (50 μ g/kg) e de progesterona (2,0 mg/kg) 54 e 6 horas antes do teste, respectivamente. Para o teste foram empregados ratos machos "iscas" comprovadamente férteis e sexualmente ativos que foram mantidos individualmente na caixa de observação descrita no item 4.10, 5 minutos antes de inserir a fêmea a ser analisada. O coeficiente de lordose (% CL) foi analisado a partir do número de lordoses realizadas pela fêmea em 10 montas realizadas pelo macho.

Para o comportamento sexual dos machos foram empregados 12 machos de cada grupo, obtidos de ninhadas distintas, com 90 dias de vida, e ratas "iscas" artificialmente receptivas. Conforme item 4.10.2, os ratos machos foram inseridos individualmente na caixa de observação do item 4.10, 5 minutos antes da fêmea "isca". Por 40 minutos, com o auxílio de cronômetros, fez-se a observação de diversos parâmetros importantes para se definir o comportamento sexual, a motivação e a eficiência copulatória dos animais analisados.

5.5 Estudo da fertilidade das proles

Para o estudo da fertilidade foram utilizados 16 ratos machos (8 controles e 8 experimentais) e 16 ratas fêmeas (8 controles e 8 experimentais), com 100 dias de vida, obtidos de ninhadas distintas cujas mães foram ou não tratadas com ração com 10% de frutos dessecados da *S. lycocarpum* durante a gestação e início da lactação.

Os ratos machos foram mantidos individualmente em gaiolas com 4 fêmeas adultas nulíparas até a constatação da prenhez, pela presença de espermatozóides no lavado vaginal das mesmas, num período não superior a 15 dias. Em seguida, os machos foram separados e as fêmeas mantidas na gaiola até completarem 21 dias de gestação, dia em que foram eutanasiadas em cuba saturada com éter. Através de laparotomia e observação minuciosa do útero, ovários e ninhada, avaliou-se a fertilidade de cada macho, conforme parâmetros descritos no item 4.11.2.

As ratas fêmeas avaliadas foram mantidas em gaiolas individuais com um macho adulto sabidamente fértil. O estudo da fertilidade foi realizado empregando-se a mesma metodologia na análise da fertilidade dos ratos machos, conforme item 4.11.1.

5.6 Dosagem dos metabólitos de hormônios sexuais nas fezes e de hormônios tireoideanos no soro de ratos

O monitoramento dos metabólitos fecais dos hormônios sexuais nas mães foi realizado nos dias DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21 em 7 mães do grupo controle e 7 mães do grupo experimental. Da mesma forma, ao completarem 30, 60 e 90 dias de vida, 7 filhotes fêmeas e 7 filhotes machos do grupo controle e 7 filhotes fêmeas e 7 filhotes machos do grupo experimental, obtidos aleatoriamente de ninhadas distintas, também tiveram amostras de suas fezes coletadas para monitoramento dos níveis de metabólitos de hormônios sexuais. A coleta, extração e dosagem dos metabólitos dos hormônios esteroidais foi realizado conforme

descrito no item 4.12.1. Ao completarem 90 dias de vida, 5 machos e 5 fêmeas de cada grupo foram decapitados para colheita de sangue dos grandes vasos cervicais. Em seguida este sangue foi centrifugado e separado seu soro para avaliação dos níveis séricos dos hormônios tireoideanos T3 (triiodotironina) e T4 (tiroxina), conforme descrito no item 4.12.2.

5.7 Dosagem dos níveis de neuroaminas cerebrais e seus metabólitos nas regiões hipotalâmica e estriatal do SNC de ratos

Para a realização das dosagens neuroquímicas, machos (n=6) e fêmeas (n=6) do grupo controle e machos (n=6) e fêmeas (n=6) do grupo experimental, todos com 140 dias de vida e obtidos de ninhadas distintas, foram decapitados, seus cérebros retirados do crânio e porções do hipotálamo e estriato processados e armazenados para posterior análise, conforme descrito no item 4.13.1.

5.8 Análise estatística

Após verificação da homocedasticidade dos dados pelo teste de Bartlett, os dados paramétricos referentes ao peso e ganho de peso materno, consumo materno de água e ração, desempenho reprodutivo, peso úmido dos órgãos das mães, razão peso úmido dos órgãos sexuais /peso corporal dos filhotes, orientação sexual, comportamento sexual de machos e fêmeas e concentrações de metabólitos de hormônios sexuais nas fezes das mães foram analisados pelo teste "t" não pareado de Student. Eventuais dados não paramétricos foram em seguida analisados pelo *post-hoc* teste de Mann-Whitney. Os dados paramétricos

referentes ao peso e ganho de peso dos filhotes, comprimento corporal e distância anogenital dos filhotes no dia PN 01, razão peso órgãos/peso corporal, estudo da fertilidade, concentração de metabólitos de hormônios sexuais nas fezes dos filhotes, níveis séricos dos hormônios tireoideanos nos filhotes e níveis estriatais e hipotalâmicos de neurotransmissores, foram analisados pela ANOVA de duas entradas. O número de filhotes mortos encontrados nos dois grupos empregados foi avaliado estatisticamente com o teste de Fisher. O nível de significância de 5% foi considerado suficiente para mostrar diferenças significativas em todos os dados analisados.

A análise estatística foi realizada com o emprego dos softwares analíticos GraphPad InStat v2.01 (GRAPHPAD, 1993) e Sigma Stat 3.0 (SPSS Inc., 2003).

Resultados

6. Resultados

6.1 Extração e identificação de alcalóides dos frutos verdes dessecados e moídos da *S. lycocarpum*

O extrato dessecado obtido conforme item 4.1 mostrou que os frutos verdes desidratados e moídos da *S. lycocarpum* possuem 1,78% de alcalóides brutos. Este valor em porcentagem resultou de simples extrapolação do peso obtido, uma vez que se partiu de 100 g de amostra.

A cromatografia em camada delgada (CCD) realizada com uma pequena alíquota do extrato dessecado, conforme descrito no item 4.2, revelou que a amostra possui duas manchas com o mesmo HRf apresentado pelos padrões de solasonina (25,0) e solamargina (37,5), o que certifica a presença destes dois alcalóides nos frutos utilizados no estudo em questão.

Após o procedimento de isolamento dos alcalóides da amostra, como descrito nos itens 4.1 e 4.2, novas CCDs foram realizadas com todas as porções obtidas e em seguida reveladas com Dragendorff. As porções de números 10 a 17 mostraram uma única mancha com o mesmo HRf do padrão de solamargina (37,5) e as porções de números 31 a 60 mostraram uma única mancha com o mesmo HRf do padrão de solasonina (25,0). As demais porções não apresentaram manchas após revelação. Este resultado indicou que o procedimento adotado foi eficaz para a separação dos glicoalcalóides.

Após total retirada da umidade do conteúdo alcaloídico dos dois frascos onde se reuniram as frações com o alcalóide solamargina e as frações com o

alcalóide solasonina, conforme descrito no item 4.2, a amostra de 100 mg revelou possuir, entre outros componentes não caracterizados, 5,9 mg de solamargina e 8,7 mg de solasonina. Portanto, a fração de alcalóides totais (1,78 g) apresentou 105,02 mg de solamargina e 154,86 mg de solasonina. Assim, os frutos verdes dessecados de *S. lycocarpum*, possuem aproximadamente 0,105% de solamargina e 0,155% de solasonina. Foi constatado que os frutos verdes empregados apresentaram 80% de umidade, desta forma os frutos verdes coletados na cidade de Itajubá-MG possuem 0,021% de solamargina e 0,031% de solasonina.

A partir destes valores e sabendo-se que uma rata prenhe consome durante a gestação e lactação cerca de 20 g de ração (conforme demonstrado na Tabela 3 do Item 6.2), e que esta ração contém 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*, o animal ingere cerca de 2,0 g de frutos secos todos os dias, o que corresponde a 2,10 mg de solamargina e 3,12 mg de solasonina diariamente.

Levando-se em consideração a estrutura química do glicoalcalóide solamargina (Figura 2A), a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (300MHz, DMSO- d_6) revelou na amostra de solamargina (Figura 6), corroborando com o espectro de solamargina obtido de frutos de *S. incanum* (FUKUHARA e KUBO, 1991): δ 0,816 (H18,s), δ 0,855 (H27,d), δ 0,960 (H21,d), δ 1,108 (H19, s), δ 1,239 (ramnose CH₃, m), δ 2,501 (H26, d), δ 3,181-3,865 (co-eluição de prótons de carboidratos), δ 4,960 (H3'',d), δ 5,016 (H1'',s), δ 5,324 (H6,s), δ 2,299 (H3'',d), δ 3,834-3,886 (H16,m), δ 3,925 (H1',d). A ressonância magnética nuclear de carbono¹³ (100MHz, DMSO- d_6) revelou na amostra de solamargina (Figura 7), espectro muito semelhante aos obtidos da solamargina presente nos frutos de *S.*

hasianum (MAHATO et al, 1980) e de *S. incanum* (FUKUHARA e KUBO, 1991): δ 38,03 (C1), δ 36,255 (C2), δ 79,08 (C3), δ 39,92 (C4), δ 140,18 (C5), δ 125,02 (C6), δ 33,12 (C7), δ 29,69 (C8), δ 60,61 (C9), δ 38,03 (C10), δ 22,29 (C11), δ 39,08 (C12), δ 40,20 (C13), δ 62,04 (C14), δ 28,02 (C15), δ 79,08 (C16), δ 65,61 (C17), δ 17,69 (C18), δ 18,86 (C19), δ 43,67 (C20), δ 15,65 (C21), δ 97,61 (C22), δ 33,12 (C23), δ 31,58 (C24), δ 29,69 (C25), δ 48,09 (Cc26), δ 18,13 (C27). Dos carboidratos: δ 100,82 (C1'), δ 82,67 (C2'), δ 77,31 (C3'), δ 78,42 (C4'), δ 78,83 (C5'), δ 61,42 (C6'), δ 101,32 (C1''), δ 71,82 (C2''), δ 71,53 (C3''), δ 75,53 (C4''), δ 69,23 (C5''), δ 17,69 (C6''), δ 101,25 (C1'''), δ 71,74 (C2'''), δ 71,52 (C3'''), δ 74,77 (C4'''), δ 77,34 (C5'''), δ 17,63 (C6''').

Levando-se em consideração a estrutura química do glicoalcalóide solasonina (Figura 2B), a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (300MHz, DMSO- d_6) revelou na amostra de solasonina (Figura 8), corroborando com o espectro de solamargina obtido de frutos de *S. incanum* (FUKUHARA e KUBO, 1991): δ 0,81 (H18,s), δ 0,86 (H27,d), δ 0,96 (H21,d), δ 1,08 (H19,s), δ 1,23-1,34 (ramnose CH₃,m), δ 2,29 (ramnose H3'',d), δ 2,50 (H26,d), δ 3,35-3,50 (co-eluição de prótons de carboidratos), δ 3,66 (glicose H1',d), δ 3,91-4,13 (H16,m), δ 5,03 (H3'',s), δ 5,19 (H1'',s), δ 5,33 (H6,s). A ressonância magnética nuclear de carbono¹³ (100MHz, DMSO- d_6) revelou na amostra de solasonina (Figura 9) espectro muito semelhante aos obtidos da solasonina presente nos frutos de *S. khasianum* (MAHATO et al, 1980) e de *S. incanum* (FUKUHARA e KUBO, 1991): δ 38,53 (C1), δ 29,70 (C2), δ 79,07 (C3), δ 38,81 (C4), δ 144,37 (C5), δ 128,56 (C6), δ 29,70 (C7), δ 28,93 (C8), δ 53,48 (C9), δ 38,04 (C10), δ 23,84 (C11), δ 40,20 (C12), δ 40,13 (C13), δ 56,78 (C14), δ 28,22 (C15), δ 79,21 (C16), δ 65,60 (C17), δ 13,79 (C18), δ 22,31

(C19), δ 41,02 (C20), δ 10,71 (C21), δ 124,98 (C22), δ 33,68 (C23), δ 32,87 (C24), δ 33,12 (25), δ 40,56 (C26), δ 23,13 (C27). Dos carboidratos: δ 100,82 (C1'), δ 82,67 (C2'), δ 77,31 (C3'), δ 78,42 (C4'), δ 78,83 (C5'), δ 61,42 (C6'), δ 101,32 (C1''), δ 71,82 (C2''), δ 71,53 (C3''), δ 75,53 (C4''), δ 69,23 (C5''), δ 17,69 (C6''), δ 125,32 (C1'''), δ 75,32 (C2'''), δ 83,43 (C3'''), δ 66,43 (C4'''), δ 67,34 (C5'''), δ 128,56 (C6''').

Figura 6 - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) do glicoalcalóide esteroideal solamargina presente na porção de alcalóides totais obtida pelo processo de extração de glicoalcalóides empregado nos frutos verdes dessecados e moídos da *S. lycocarpum*.

Figura 7 - Ressonância magnética nuclear de carbonos (^{13}C) do glicoalcalóide esteroide solamargina presente na porção de alcalóides totais obtida pelo processo de extração de glicoalcalóides empregado nos frutos verdes dessecados e moídos da *S. lycocarpum*.

Figura 8 - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) do glicoalcalóide esteroide solasonina presente na porção de alcalóides totais obtida pelo processo de extração de glicoalcalóides empregado nos frutos verdes dessecados e moídos da *S. lycocarpum*.

6.2 Avaliação da toxicidade materna

A Tabela 1 apresenta os efeitos da exposição materna a ração com 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* no peso corporal de ratas durante a gestação e lactação. A análise estatística revelou, nas mães experimentais, menor peso nos dias DG 18 [$t=2,039$; $p<0,05$] e DG 22 [$t=3,026$; $p<0,01$] da gestação e nos dias PN 01 [$t=3,115$; $p<0,05$] e PN 07 [$t=4,091$; $p<0,001$] da lactação.

A Tabela 2 apresenta os efeitos da exposição materna aos frutos verdes da *S. lycocarpum* à 10% na ração no ganho de peso de ratas tratadas durante a gestação e lactação. Durante a gestação foi observado menor ganho de peso das mães experimentais nos intervalos que compreenderam os dias DG 06-10 [$t=3,846$; $p<0,001$], DG 14-18 [$t=3,115$; $p<0,01$], DG 18-22 [$t=3,597$; $p<0,001$] e DG 01-22 [$t=4,139$; $p<0,001$]. Durante a lactação maior ganho de peso foi observado nas mães experimentais nos intervalos que compreenderam os dias PN 07-14 [$t=3,649$; $p<0,001$], PN 14-21 [$t=2,248$; $p<0,05$] e PN 01-21 [$t=3,866$; $p<0,001$].

A Figura 10 ilustra o peso e ganho de peso dos animais nos diferentes períodos analisados.

Tabela 1 – Peso corporal de ratas tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão.

Período	Dias	Controle (n=21)	Experimental (n=25)
Gestação	01	223,19 ± 6,04	221,16 ± 4,80
	06	237,29 ± 5,51	235,64 ± 4,31
	10	252,48 ± 5,30	244,04 ± 4,56
	14	269,10 ± 4,97	260,24 ± 4,59
	18	297,43 ± 5,21	282,76 ± 4,93*
	22	342,38 ± 5,47	317,08 ± 6,13**
Lactação	01	266,76 ± 4,87	246,24 ± 4,44**
	07	282,57 ± 4,24	258,76 ± 3,97***
	14	286,29 ± 4,05	277,76 ± 3,72
	21	275,62 ± 4,32	275,48 ± 3,64

* p < 0,05 ; ** p < 0,01; *** p < 0,001 – teste “t” de Student.

Tabela 2 – Ganho de peso corporal de ratas tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão.

Período	Intervalo	Controle (n=21)	Experimental (n=25)
Gestação	01 - 06	13,62 ± 1,17	14,96 ± 1,29
	06 - 10	15,19 ± 0,94	8,40 ± 1,41***
	10 - 14	16,81 ± 1,18	16,20 ± 1,21
	14 - 18	28,33 ± 0,99	22,48 ± 1,50**
	18 - 22	44,95 ± 1,64	34,32 ± 2,33***
	01 - 22	119,19 ± 3,32	95,92 ± 4,33***
Lactação	01 - 07	17,48 ± 1,79	12,52 ± 3,36
	07 - 14	3,71 ± 2,64	19,00 ± 3,13***
	14 - 21	-10,67 ± 3,09	-02,28 ± 2,23*
	01 - 21	8,86 ± 4,14	26,72 ± 2,42***

* p < 0,05 ; ** p < 0,01; *** p < 0,001 – teste “t” de Student.

Figura 10 – Peso e ganho de peso das mães tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A Tabela 3 apresenta as médias e os erros padrão referentes ao consumo de ração de ratas expostas ou não (grupo controle) durante a gestação e lactação aos frutos verdes da *S. lycocarpum* (10% na ração). A concentração (g) aproximada dos glicoalcalóides solasonina e solamargina ingeridos pelas mães experimentais nos diferentes dias também está apresentada. A análise estatística revelou menor consumo de ração das mães experimentais no dia 06 da gestação [$t=3,898$; $p<0,0003$], dia em que passaram a receber ração com 10% de frutos, e no dia PN 07 [$t=2,579$; $p<0,05$] da lactação. No dia PN 01 [$t=2,041$; $p<0,05$] as mães experimentais apresentaram maior consumo.

A Tabela 4 apresenta as médias e os erros padrão referentes à ingestão hídrica de ratas expostas ou não (grupo controle) durante a gestação e lactação aos frutos verdes da *S. lycocarpum* (10% na ração). A análise estatística revelou menor ingestão hídrica das mães experimentais no dia 18 da gestação [$t=2,285$; $p<0,05$] e no dia 07 da lactação [$t=2,379$; $p<0,05$].

A Figura 11 ilustra o consumo de ração e a ingestão hídrica dos animais nos diferentes períodos analisados.

Tabela 3 – Consumo de ração (g) de ratas tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão e a concentração média (mg) dos glicoalcalóides solamargina e solasonina ingeridos pelas ratas experimentais nos diversos dias de análise.

Período	Dias	Controle (n=21)	Experimental (n=25)	Solamargina/ Solasonina (mg)
Gestação	01	15,29 ± 0,76	14,32 ± 0,80	15,039 / 22,319
	06	17,48 ± 0,87	10,68 ± 1,42***	11,216 / 16,646
	10	19,95 ± 0,44	20,08 ± 1,01	21,088 / 31,297
	14	21,81 ± 0,83	21,48 ± 0,78	22,558 / 33,478
	18	21,86 ± 0,37	22,00 ± 0,84	23,104 / 34,289
	22	14,71 ± 1,31	14,72 ± 1,41	15,459 / 22,943
Lactação	01	22,48 ± 0,80	25,08 ± 0,96*	26,339 / 39,089
	07	35,48 ± 0,92	31,48 ± 1,19*	33,060 / 49,065
	14	51,67 ± 0,84	53,52 ± 1,23	56,207 / 83,416
	21	58,24 ± 1,13	58,44 ± 1,37	61,374 / 91,085

* p < 0,05 – teste “t” de Student.

Tabela 4 – Ingestão hídrica (ml) de ratas tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão.

Período	Dias	Controle	Experimental
Gestação	01	26,10 ± 1,44	29,60 ± 1,51
	06	32,95 ± 1,84	32,56 ± 2,26
	10	34,00 ± 1,41	32,20 ± 0,93
	14	38,57 ± 1,68	34,72 ± 1,28
	18	40,62 ± 1,58	36,60 ± 0,91*
	22	24,95 ± 2,11	24,24 ± 1,68
Lactação	01	34,81 ± 1,07	35,72 ± 1,07
	07	45,05 ± 1,89	39,16 ± 1,62*
	14	76,29 ± 2,83	73,32 ± 2,73
	21	91,86 ± 2,24	85,76 ± 3,10

* p < 0,05 – teste “t” de Student.

Figura 11 - Consumo de ração (A e B) e ingestão hídrica (C e D) de ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação e lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

6.3 Desempenho reprodutivo e avaliação perinatal

A Tabela 5 e a Figura 12 apresentam os parâmetros de desempenho reprodutivo avaliados nas mães tratadas ou não (grupo controle), durante a gestação (DG 06-22), com ração acrescida de 10% de frutos da *S. lycocarpum*.

O teste "t" de Student revelou não haver alterações na duração da prenhez (dias) e no número total de filhotes. O dia de registro da descida dos testículos e abertura vaginal também não mostrou-se alterado na prole. O peso das ninhadas experimentais mostrou-se reduzido no dia PN 01 [$t=1,910$, $p<0,01$]. Ao nascimento 20% das ninhadas experimentais ($n=5$ ninhadas) apresentaram entre um ou dois filhotes natimortos. O teste de Fisher revelou significativo número de filhotes experimentais mortos em relação ao número total de filhotes ($p<0,001$).

A ANOVA de duas entradas revelou não haver alterações provenientes dos fatores tratamento e sexo, nem interação entre os mesmos, na proporção entre filhotes fêmeas e machos. O comprimento corporal mostrou-se alterado pelos fatores sexo [$F(1/75)=6,160$; $p<0,05$] uma vez que machos apresentaram maior comprimento corporal que fêmeas (dimorfismo sexual), e tratamento [$F(1/75)=15,793$; $p<0,05$] uma vez que os animais experimentais apresentaram menor comprimento corporal que os animais controle. Não houve interação entre os fatores. A razão entre a distância anogenital e a raiz cúbica do peso corporal dos filhotes no dia PN 01 mostrou-se alterada pelo fator sexo [$F(1/75)=539,818$; $p<0,001$] e não pelo fator tratamento. Não ocorreu interação entre os dois fatores. O teste "t" de Student revelou não haver alterações significativas na distância anogenital entre filhotes dos grupos controle e experimental.

Tabela 5 – Desempenho reprodutivo de ratas tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. São apresentados as médias e respectivos erros padrão. A ninhada foi considerada a unidade.

Parâmetros avaliados	Controle (n=21)	Experimental (n=25)
Duração da prenhez (dias) ^a	21,95 ± 0,08	22,08 ± 0,06
Nº de ninhadas com filhotes natimortos ^a	00	05*
Nº filhotes mortos / nº total de filhotes ^b	0/443	14/443***
Peso das ninhadas PN 01 (g) ^a	63,05 ± 2,49	55,40 ± 3,01**
Nº de filhotes ♂ ^a	04,76 ± 0,32	04,84 ± 0,40
Nº de filhotes ♀ ^a	05,48 ± 0,43	04,68 ± 0,36
Comprimento corporal ♂ PN 01(cm) ^c	05,07 ± 0,05	04,97 ± 0,06*
Comprimento corporal ♀ PN 01(cm) ^c	04,79 ± 0,07	04,66 ± 0,07*
D.A. / $\sqrt[3]{\text{peso}}$ ♂ PN 01 ^c	02,06 ± 0,06	01,99 ± 0,05
D.A. / $\sqrt[3]{\text{peso}}$ ♀ PN 01 ^c	00,79 ± 0,06	00,70 ± 0,05
Dia da descida dos testículos ^a	20,52 ± 0,11	20,56 ± 0,10
Dia da abertura vaginal ^a	36,48 ± 0,21	36,52 ± 0,19

^a teste "t" de student - * p<0,05; ** p<0,01

^b teste de Fisher (nº de filhotes mortos / nº total de filhotes) - *** p<0,001

^c ANOVA de duas entradas - * p<0,05.

D.A. / $\sqrt[3]{\text{peso}}$ = razão entre a distância anogenital (em mm) e a raiz cúbica do peso corporal (g) dos filhotes no dia PN 01.

Figura 12 - Alguns parâmetros analisados no estudo do desempenho reprodutivo de mães tratadas durante a gestação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*: A) duração da prenhez; B) peso da ninhada no dia PN 01; C) n° de filhotes; D) comprimento corporal dos filhotes no dia PN 01; E) razão entre a distância anogenital (mm) e a $\sqrt[3]{\text{do peso (g)}}$ dos filhotes no dia PN 01.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A Tabela 6 apresenta as alterações provenientes da exposição aos frutos verdes da *S. lycocarpum* no peso corporal das proles. A ANOVA de duas entradas revelou alterações provenientes dos fatores tratamento e sexo, sem interação entre eles, nos dias PN 01 [tratamento: $F(1/91)=4,763$ e $p<0,05$; sexo: $F(1/91)=4,235$ e $p<0,05$], PN 04 [tratamento: $F(1/91)=4,184$ e $p<0,05$; sexo: $F(1/91)=6,233$ e $p<0,05$], PN 07 [tratamento: $F(1/91)=38,174$ e $p<0,001$; sexo: $F(1/91)=6,697$ e $p<0,001$], PN 10 [tratamento: $F(1/91)=28,813$ e $p<0,001$; sexo: $F(1/91)=3,465$ e $p<0,05$] e PN 14 [tratamento: $F(1/91)=7,118$ e $p<0,01$; sexo: $F(1/91)=6,536$ e $p<0,05$], onde os animais experimentais revelaram menor peso corporal quando comparados aos animais controle e os machos revelaram maior peso corporal que as fêmeas. No dia PN 17 o fator tratamento, isoladamente, provocou redução no peso corporal dos animais experimentais [$F(1/91)=4,226$; $p<0,05$]. Não ocorreu interação entre os fatores. Alterações no peso provenientes apenas do fator sexo foram observados nos dias PN 21 [$F(1/91)=9,144$; $p<0,01$], PN30 [$F(1/91)=30,722$; $p<0,001$] e PN 60 [$F(1/91)=384,547$; $p<0,001$], onde os machos revelaram possuir maior peso que as fêmeas. Interação entre os fatores não foi verificado nestes dias. Alterações provenientes dos fatores tratamento e sexo, sem interação entre eles, foram observadas nos dias PN 75 [tratamento: $F(1/91)=4,317$ e $p<0,05$; sexo: $F(1/91)=803,880$ e $p<0,001$] e PN 90 [tratamento: $F(1/91)=11,705$ e $p<0,001$; sexo: $F(1/91)=754,980$ e $p<0,001$], onde os machos revelaram possuir maior peso que as fêmeas e os animais experimentais revelaram possuir menor peso que os animais controle.

Tabela 6 – Peso corporal da prole de ratos cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão.

Dias	Machos		Fêmeas	
	Controle (n=21)	Experimental (n=25)	Controle (n=21)	Experimental (n=25)
01	5,71 ± 0,12	5,36 ± 0,17*	5,38 ± 0,18	5,00 ± 0,18*
04	9,76 ± 0,24	9,04 ± 0,29*	8,91 ± 0,41	8,40 ± 0,25*
07	15,38 ± 0,25	13,48 ± 0,33***	14,62 ± 0,24	12,60 ± 0,37***
10	23,29 ± 0,33	21,20 ± 0,43**	22,62 ± 0,22	20,36 ± 0,50**
14	32,91 ± 0,53	31,12 ± 0,72**	31,19 ± 0,56	29,60 ± 0,64**
17	39,86 ± 0,42	38,36 ± 0,72*	38,71 ± 0,39	37,72 ± 0,68*
21	51,76 ± 1,04	50,56 ± 0,96	49,14 ± 0,94	47,52 ± 0,79
30	94,48 ± 1,36	93,44 ± 1,42	86,10 ± 1,51	85,84 ± 1,43
60	277,52 ± 5,71	278,02 ± 4,83	198,00 ± 2,50	191,84 ± 3,06
75	351,19 ± 5,93	339,80 ± 5,10*	225,14 ± 2,55	218,40 ± 2,93*
90	391,19 ± 6,74	368,80 ± 6,46***	243,52 ± 2,87	230,28 ± 3,39***

* p < 0,05; ** p < 0,001 e *** p < 0,0001 – ANOVA de duas entradas.

A Tabela 7 apresenta os efeitos dos frutos verdes da *S. lycocarpum* no ganho de peso das proles. A ANOVA de duas entradas revelou no período PN 01-07 menor ganho de peso dos animais experimentais proveniente do fator tratamento [$F(1/91)=29,971$; $p<0,001$]. Neste período, influência do fator sexo e interação entre os fatores não foram observados. No período PN 07-14 o ganho de peso dos animais não foi alterado pelos fatores tratamento e sexo. Nos períodos PN 14-21 [$F(1/91)=4,720$; $p<0,05$], PN 21-30 [$F(1/91)=12,618$; $p<0,001$], PN 30-60 [$F(1/91)=358,318$; $p<0,001$] e PN 60-75 [$F(1/91)=94,600$; $p<0,001$] apenas o fator sexo mostrou interferir no ganho de peso, uma vez que os machos apresentaram maior ganho de peso do que as fêmeas. Nos períodos PN 75-90 [tratamento: $F(1/91)=9,870$ e $p<0,01$; sexo: $F(1/91)=55,994$ e $p<0,001$] e PN 01-90 [tratamento: $F(1/91)=10,549$ e $p<0,01$; sexo: $F(1/91)=763,527$ e $p<0,001$] alterações provenientes dos fatores tratamento e sexo, sem interação entre eles foram observadas, revelando nos animais experimentais menor ganho de peso e, nos machos, maior ganho de peso do que nas fêmeas.

A Figura 13 ilustra o peso corporal e o ganho de peso das proles.

Tabela 7 – Ganho de peso da prole de ratos cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão.

Período	Machos		Fêmeas	
	Controle (n=21)	Experimental (n=25)	Controle (n=21)	Experimental (n=25)
01 – 07	9,76 ± 0,24	8,12 ± 0,30***	9,24 ± 0,28	7,60 ± 0,34***
07 – 14	17,71 ± 0,65	17,64 ± 0,60	16,29 ± 0,46	17,00 ± 0,47
14 – 21	18,86 ± 0,75	19,44 ± 0,52	17,95 ± 0,55	17,92 ± 0,40
21 – 30	42,71 ± 1,51	42,88 ± 1,44	37,29 ± 1,41	38,32 ± 1,25
30 – 60	183,00 ± 5,97	184,76 ± 4,05	111,90 ± 2,67	106,00 ± 2,48
60 – 75	73,67 ± 6,10	60,68 ± 4,91	27,14 ± 2,52	26,68 ± 1,69
75 – 90	40,00 ± 3,54	29,92 ± 3,21***	18,38 ± 1,51	11,76 ± 1,73***
01 – 90	385,48 ± 6,69	364,64 ± 6,45***	238,14 ± 2,89	225,28 ± 3,37***

*** p < 0,001 – ANOVA de duas entradas.

Figura 13 – Peso e ganho de peso de filhotes fêmeas (A e C) e de filhotes machos (B e D) expostos ou não (grupo controle) durante a gestação e início da lactação aos frutos da *S. lycocarpum*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

6.4 Avaliação do ciclo estral

O ciclo estral foi acompanhado diariamente pela manhã, conforme descrito no item 4.7, por um período de 21 dias em 10 fêmeas de cada grupo. As fêmeas foram obtidas de ninhadas distintas ao completarem 30 dias de vida. Não foram encontradas anormalidades na duração de cada fase do ciclo estral das ratas experimentais, conforme demonstrado abaixo, na Tabela 8.

Tabela 8 – Duração (em dias) em cada fase do ciclo estral analisado por 21 dias em fêmeas adultas cujas mães foram tratadas ou não (controle) durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão (n=8/grupo).

Fase do ciclo estral	Controle	Experimental
Proestro	2,9 ± 0,4	2,5 ± 0,2
Estro	1,8 ± 0,3	1,4 ± 0,2
Metaestro	1,6 ± 0,2	1,8 ± 0,3
Diestro	3,3 ± 0,3	3,4 ± 0,3
Intervalo entre ciclos	12,3 ± 0,2	12,4 ± 0,2

Não houveram diferenças significantes estatisticamente nas fases do ciclo estral das ratas do grupo experimental quando comparadas com as ratas do grupo controle (teste “t” de Student).

6.5 Análise do peso úmido e estudo histológico dos diversos órgãos

A Tabela 9 mostra os efeitos da exposição materna a ração com 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* no peso de vários órgãos, no dia PN 21. O teste “t” de Student revelou não haver alterações no peso úmido dos órgãos nas mães no dia do desmame de suas proles. O estudo histológico também não revelou anormalidades entre os grupos controle e experimental nos diversos tecidos analisados.

O peso de vários órgãos mostraram-se alterados nos diferentes dias de análise das proles experimentais. Para uma verificação mais exata dos efeitos da exposição aos frutos da *S. lycocarpum* sobre o peso dos órgãos, a razão peso órgão/peso corporal dos diversos órgãos das proles feminina e masculina foi calculada nos diferentes dias de análise. A razão peso órgão/peso corporal de diversos órgãos da prole feminina está demonstrada na Tabela 10 e Figura 14, e da prole masculina na Tabela 11 e Figura 15.

A ANOVA de duas entradas, empregando os fatores tratamento e sexo, revelou no dia PN 14 alterações nas razões peso da adrenal/peso corporal, peso do rim/peso corporal e peso do coração/peso corporal. Na adrenal, o fator sexo revelou maior razão em machos do que em fêmeas [$F(1/38)=8,170$; $p<0,01$]. O fator tratamento revelou maior razão do rim [$F(1/38)=4,530$; $p<0,05$] e do coração [$F(1/38)=14,856$; $p<0,001$] nos animais experimentais.

No dia PN 21 alterações foram observadas na razão do pulmão, adrenal e timo. O fator tratamento revelou maior razão do pulmão nos animais experimentais [$F(1/38)=7,890$; $p<0,01$] quando comparado com a mesma razão nos animais

controle. Menor razão da adrenal nos animais experimentais foi observada [$F(1/38)=5,172$; $p<0,05$]. O fator sexo revelou que as fêmeas apresentaram maior razão do timo [$F(1/38)=13,111$; $p<0,001$] que os machos. Interação entre os fatores não foi constatado.

No dia PN 30 somente o fator sexo revelou menor razão do pulmão [$F(1/38)=5,477$; $p<0,05$] e timo [$F(1/38)=6,618$; $p<0,05$] nos machos quando comparado com a mesma razão nas fêmeas, indicando a presença do dimorfismo sexual, uma vez que machos são naturalmente maiores que fêmeas e, desta forma, a razão pelo peso corporal torna-se menor. Os fatores tratamento e sexo, sem interação, mostraram alterações na razão do baço aos PN 30 [tratamento: $F(1/38)=4,345$ e $p<0,05$; sexo: $F(1/38)=9,010$ e $p<0,01$], revelando maior razão do baço dos machos experimentais em relação aos machos controle e, maior razão dos machos em relação às fêmeas.

No dia PN 60 o fator sexo, na ausência do fator tratamento e não ocorrência de interação entre os dois fatores, revelou maior razão do baço [$F(1/38)=4,555$; $p<0,05$], pâncreas [$F(1/38)=13,842$; $p<0,001$], pulmão esquerdo [$F(1/38)=8,252$; $p<0,01$], adrenal [$F(1/38)=15,486$; $p<0,001$] e timo [$F(1/38)=15,048$; $p<0,001$] nas fêmeas quando comparado com a razão dos mesmos órgãos nos machos, indicando novamente a presença do dimorfismo sexual.

No dia PN 90 somente a razão do fígado não mostrou-se alterada. O fator sexo, na ausência do fator tratamento e não ocorrência de interação entre os dois fatores, revelou maior razão do pulmão [$F(1/38)=19,969$; $p<0,001$], timo [$F(1/38)=44,658$; $p<0,001$], baço [$F(1/38)=36,490$; $p<0,001$], pâncreas [$F(1/38)=40,639$; $p<0,001$], adrenal [$F(1/38)=21,344$; $p<0,001$], rim [$F(1/38)=5,240$;

$p < 0,05$] e coração [$F(1/38)=12,732$; $p < 0,001$] nas fêmeas quando comparado com a razão dos mesmos órgãos nos machos.

O teste "t" revelou na prole fêmea experimental com PN 21, menor razão do útero [$t=2,683$; $p < 0,05$] e com PN 30 maior razão dos ovários [$t=2,459$; $p < 0,05$]. Na prole experimental masculina o teste "t" revelou no dia PN 14 maior razão dos testículos [$t=3,697$; $p < 0,01$].

A Figura 16 ilustra discreta degeneração (vacuolização) de células do folículo interno do útero de ratas experimentais com PN 60. Outras alterações não foram encontradas no estudo histológico realizado com os demais órgãos analisados nos filhotes fêmeas nas diferentes fases de seu desenvolvimento, mostrando possível reversibilidade do quadro.

A Figura 17 ilustra vacuolização e menor número de espermatogônias (provenientes de degeneração de células germinativas) nos ductos testiculares de filhotes machos experimentais com PN 60. Reduzido número de células pode ser claramente observada. Nada se observou nos demais tecidos analisados nos diferentes dias de desenvolvimento dos filhotes machos. No dia PN 90 estas lesões nos ductos testiculares também foram observadas, caracterizando as lesões como irreversíveis.

Tabela 9 – Peso úmido de órgãos (g) de ratas tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes de *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. As mães foram eutanasiadas no 21º dia da lactação (PN 21). São apresentados as médias e os respectivos erros padrão.

Órgãos	Controle (n=15)	Experimental (n=15)
Ovário direito	0,103 ± 0,007	0,094 ± 0,007
Ovário esquerdo	0,099 ± 0,005	0,087 ± 0,007
Útero	0,463 ± 0,030	0,485 ± 0,043
Baço	0,653 ± 0,027	0,590 ± 0,015
Pâncreas	1,095 ± 0,056	1,086 ± 0,030
Adrenal esquerdo	0,059 ± 0,003	0,055 ± 0,040
Rim esquerdo	1,200 ± 0,024	1,164 ± 0,020
Timo	0,315 ± 0,014	0,282 ± 0,016
Pulmão	0,774 ± 0,039	0,814 ± 0,053
Fígado	18,627 ± 0,604	19,019 ± 0,493
Coração	1,275 ± 0,038	1,212 ± 0,042

p > 0,05 – teste “t” de Student.

Tabela 10 – Razão peso úmido de órgãos/peso corporal (10^{-3}) da prole feminina aos PN 14, PN 21, PN 30, PN 60 e PN 90, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão (n=10/grupo).

Órgãos	PN 14		PN21		PN 30		PN 60		PN 90	
	Controle	Exp.	Controle	Exp.	Controle	Exp.	Controle	Exp.	Controle	Exp.
Ovários ^a	0,36±0,03	0,33±0,03	0,32±0,02	0,35±0,03	0,29±0,01	0,34±0,02*	0,29±0,02	0,29±0,09	0,54±0,01	0,32±0,02
Útero ^a	0,93±0,04	0,98±0,04	1,15±0,14	0,77±0,04*	0,70±0,04	0,81±0,005	1,82±0,18	1,52±0,07	1,65±0,13	1,90±0,16
Baço ^b	5,26±0,44	5,03±0,19	5,01±0,32	5,00±0,20	3,74±0,17	3,80±0,40*	2,68±0,10	2,88±0,14	2,46±0,10	2,51±0,05
Pâncreas ^b	2,49±0,23	2,58±0,11	3,21±0,14	3,46±0,17	4,09±0,11	4,43±0,13	3,77±0,25	3,88±0,15	3,41±0,22	3,44±0,19
Adrenal ^b	0,20±0,02	0,25±0,03	0,23±0,02	0,27±0,03*	0,18±0,02	0,19±0,01	0,21±0,02	0,16±0,02	0,17±0,01	0,17±0,02
Rim ^b	5,94±0,34	6,4±0,18*	6,11±0,27	6,09±0,26	5,30±0,14	5,66±0,14	3,75±0,06	3,64±0,06	3,41±0,43	3,39±0,06
Coração ^b	5,83±0,72	6,9±0,9***	6,41±0,18	6,39±0,27	4,94±0,15	4,71±0,14	3,80±0,13	3,44±0,05	3,40±0,10	3,50±0,05
Timo ^b	4,69±0,37	4,73±0,22	4,89±0,22	4,90±0,14	4,72±0,13	4,81±0,10	3,07±0,14	2,79±0,12	2,15±0,10	2,01±0,10
Pulmão ^b	8,34±0,55	8,40±0,84	5,99±0,21	7,34±0,19**	2,55±0,09	2,76±0,09	2,21±0,17	1,95±0,12	2,22±0,10	2,23±0,08
Fígado ^b	38,0±3,00	39,2±1,10	48,9±2,78	48,2±1,90	45,0±1,12	44,6±1,27	40,8±0,79	40,5±0,78	37,2±1,42	37,4±0,93
Hipotálamo ^b	_____	_____	0,58±0,09	0,56±0,03	0,28±0,03	0,31±0,02	0,15±0,001	0,14±0,01	0,11±0,01	0,10±0,01

^a Teste "t" de Student - * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001.

^b ANOVA de duas entradas.

Exp.= grupo experimental.

Figura 14 – Razão peso úmido de órgãos/peso corporal (10^{-3}) da prole feminina aos PN 14, PN 21, PN 30, PN 60 e PN 90, cujas mães foram tratadas ou não (controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Tabela 11 – Razão peso úmido de órgãos/peso corporal (10^{-3}) da prole masculina nos dias PN 14, PN 21, PN 30, PN 60 e PN 90, cujas mães foram tratadas ou não (controle) com ração contendo 10% de frutos verdes de *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. São apresentados as médias e respectivos erros padrão (n=10/grupo).

Órgãos	PN 14		PN 21		PN 30		PN 60		PN 90	
	Controle	Exp.	Controle	Exp.	Controle	Exp.	Controle	Exp.	Controle	Exp.
Testículos ^a	1,61±0,03	1,9±0,07**	2,40±0,07	2,70±0,02	3,93±0,16	3,91±0,10	5,54±0,12	5,46±0,09	4,75±0,17	4,47±0,33
Epidídimos ^a	—	—	2,82±0,10	2,81±0,17	1,33±0,17	1,28±0,06	2,42±0,12	2,36±0,09	3,27±0,10	3,14±0,14
Ves.Sem. ^a	0,11±0,02	0,13±0,03	0,19±0,01	0,20±0,01	0,17±0,01	0,17±0,01	1,66±0,15	1,74±0,10	2,15±0,15	2,04±0,16
Baço ^b	4,73±0,14	5,17±0,30	5,01±0,30	5,62±0,43	3,91±0,31	4,35±0,54*	2,52±0,11	2,56±0,10	2,12±0,06	1,97±0,07
Pâncreas ^b	2,29±0,09	2,48±0,11	2,99±0,12	3,22±0,20	4,24±0,09	4,35±0,12	3,20±0,18	3,09±0,14	2,11±0,09	2,60±0,14
Adrenal ^b	0,28±0,02	0,33±0,03	0,22±0,01	0,28±0,02*	0,20±0,09	0,20±0,09	0,13±0,10	0,12±0,06	0,11±0,01	0,12±0,01
Rim ^b	5,46±0,09	6,13±0,32*	5,64±0,20	5,81±0,29	5,40±0,12	5,37±0,10	3,61±0,06	3,55±0,08	3,25±0,08	3,15±0,06
Coração ^b	6,06±0,49	6,9±0,9***	6,61±0,40	6,46±0,30	4,67±0,09	4,71±0,22	3,57±0,11	3,51±0,11	3,27±0,08	3,08±0,08
Tím ^b	4,73±0,17	4,53±0,26	4,15±0,16	4,31±0,21	4,23±0,14	4,59±0,17	2,49±0,08	2,53±0,08	1,45±0,06	1,59±0,06
Pulmão ^b	7,84±0,53	8,29±0,59	5,57±1,33	7,30±1,54**	2,50±0,07	2,46±0,06	1,77±0,11	1,69±0,06	1,76±0,08	1,88±0,10
Fígado ^b	31,7±1,4	38,4±1,9	44,1±2,0	48,0±2,5	44,0±1,1	46,3±1,0	40,6±0,8	42,7±1,36	37,7±0,99	34,9±0,84
Hipotálamo ^b	—	—	0,56±0,09	0,63±0,07	0,25±0,02	0,32±0,02	0,13±0,01	0,11±0,01	0,056±0,01	0,060±0,01

^a Teste "t" de Student - *p < 0,05;

^b ANOVA de duas entradas - * p < 0,05; ** p < 0,001; *** p < 0,001

Exp. = grupo experimental; Ves. Sem. = vesícula seminal.

Figura 15 – Razão peso úmido de órgãos/peso corporal (10^{-3}) da prole masculina aos PN 14, PN 21, PN 30, PN 60 e PN 90, cujas mães foram tratadas ou não (controle) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos de *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Figura 16 – Corte histológico de útero de filhotes fêmeas controle (A e B) e experimental (C e D) com PN 60. Observe (setas) a degeneração das células uterinas do folículo epitelial nas fotos C e D, cujo material é proveniente de animais experimentais. (20x; H&E)

Figura 17 - Corte histológico de testículo de filhotes machos controle (A e B) e experimental (C e D) com PN 60. Observe (setas) a presença de vacúolos e o menor número de espermatogônias (provenientes de degeneração de células germinativas testiculares) nas fotos C e D, obtidas de testículos de animais experimentais. Fotos A e C (10x; H&E); fotos B e D (20x; H&E).

6.6 Avaliação do comportamento sexual

6.6.1 Orientação sexual de machos

A Tabela 12 e Figura 18 apresentam as médias e os respectivos erros padrão dos parâmetros avaliados no estudo da orientação sexual da prole masculina, com 90 dias de vida, cujas mães foram tratadas, do DG 06 ao PN 07, com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados da *S. lycocarpum*. A análise estatística revelou não haver alterações na orientação sexual dos filhotes machos entre os grupos controle e experimental. Em ambos os grupos foi nítida a preferência dos machos pela fêmea “isca”, já que o tempo de permanência dos animais foi maior nas regiões FI e FII, regiões justaposta e próxima, respectivamente, ao compartimento onde a fêmea “isca” ficou alojada.

Tabela 12 – Tempo de permanência (segundos) em diferentes áreas de uma arena projetada para a mensuração da orientação sexual de ratos machos adultos (PN 90) cujas mães foram tratadas durante a gestação (DG 06 a DG 22) e início da lactação (até PN 07) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão (n=12 por grupo).

Área	Controle (n=12)	Experimental (n=12)
MI	175,08 ± 19,33	170,58 ± 23,35
MII	95,00 ± 12,34	86,92 ± 07,99
FI	521,42 ± 33,58	589,33 ± 40,25
FII	167,75 ± 19,16	168,75 ± 07,84

p > 0,05 – teste “t” de Student.

MI= área justaposta ao compartimento em que o macho isca em idade fértil permaneceu alojado;

MII= área próxima ao compartimento em que o macho isca em idade fértil permaneceu alojado;

FI= área justaposta ao compartimento em que a fêmea isca com estro induzido permaneceu alojada;

FII= área próxima ao compartimento em que a fêmea isca com estro induzido permaneceu alojada.

Figura 18 - Orientação sexual (tempo de permanência, em segundos, em cada área da arena) de ratos machos adultos com PN 90 cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG06 a DG22) e início da lactação (até PN 07) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* ($p > 0,05$; teste "t").

6.6.2 Comportamento sexual de fêmeas

A Tabela 13 e a Figura 19 apresentam as médias e os respectivos erros padrão do coeficiente de lordose avaliado a partir do estudo do comportamento sexual da prole feminina com PN 100, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle), do DG 06 ao PN 07, com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados da *S. lycocarpum*. A análise estatística revelou reduzido coeficiente de lordose nas fêmeas experimentais [$t=2,276$; $F(1/19)=2,450$ e $p=0,0346$].

Tabela 13 – Coeficiente de lordose de ratas fêmeas com PN 100 cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*.

Grupos	n	Coeficiente de lordose (%)
Controle	10	74,00 ± 6,18
Experimental	11	48,18 ± 9,23*

* $p < 0,05$ –teste “t” de student.

Figura 19 - Coeficiente de lordose de ratas fêmeas (PN 100) cujas mães foram tratadas ou não (controle) durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*. * $p < 0,05$ –teste “t” de student.

6.6.3 Comportamento sexual de machos

A Tabela 14 apresenta os parâmetros analisados no estudo do comportamento sexual masculino de ratos com PN 100, cujas mães foram tratadas ou não (controle) na gestação e lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*. A análise estatística empregada revelou não haver alterações nos diversos parâmetros analisados.

Os estudos de motivação e potência sexuais realizados nestes animais – eficiência copulatória, índice de atividade sexual, frequência de montas e de intromissões e índice neuromotor – também não revelaram alterações após análise estatística dos dados obtidos. As médias e respectivos erros padrão destes parâmetros avaliados estão expostos na Tabela 15.

A Figura 20 ilustra os resultados obtidos referentes ao comportamento sexual, motivação e eficiência copulatória dos ratos machos analisados com PN 100, cujas mães foram tratadas durante a gestação e lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*.

Tabela 14 – Comportamento sexual de ratos machos, com PN 100, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* durante a gestação e início da lactação. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão dos parâmetros analisados.

Parâmetros	Controle (n=12)	Experimental (n=12)
Latência 1ª monta (s)	31,333 ± 7,438	56,667 ± 14,306
Latência 1ª intromissão (s)	42,750 ± 8,369	68,917 ± 57,393
Latência 1ª ejaculação (s)	1417,4 ± 98,455	1602,9 ± 109,83
Nº de montas incompletas em 10 min.	25,250 ± 2,365	23,750 ± 3,129
Nº de montas até ejaculação	10,667 ± 2,287	12,167 ± 2,170
Nº de intromissões até ejaculação	51,500 ± 6,682	47,417 ± 5,222
Latência 1ª monta pós-ejaculação (s)	311,67 ± 25,933	314,92 ± 12,242
Total de montas em 40 min.	13,167 ± 2,174	14,500 ± 2,560
Total de intromissões em 40 min.	73,500 ± 5,226	66,333 ± 7,333
Total de ejaculações em 40 min.	1,667 ± 0,1880	1,333 ± 0,1880

p > 0,05 – teste “t” de Student.

Tabela 15 - Índice de atividade sexual, frequência de montas, frequência de intromissões, eficiência copulatória e índice neuromotor de ratos adultos (PN 100) cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06 a DG 22) e início da lactação (até PN 07) com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos da *S. lycocarpum*. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão (n=12 por grupo).

Parâmetros	Controle (n=12)	Experimental (n=12)
Índice de atividade sexual	11,883 ± 0,2757	11,170 ± 0,5686
Frequência de montas	59,917 ± 8,4790	58,500 ± 10,788
Frequência intromissões	324,92 ± 23,929	282,25 ± 50,312
Eficiência copulatória	85,417 ± 1,8970	81,667 ± 2,6290
Índice neuromotor	2,24 ± 0,22	1,98 ± 0,28

p > 0,05 – teste “t” de Student.

Figura 20 – Comportamento sexual de ratos machos adultos (PN 100) cujas mães foram tratadas ou não (controle) durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*.
EC = eficiência copulatória; IAS = índice de atividade sexual; INM = índice neuromotor; FM = frequência de montas ; FI = frequência de intromissões

6.7 Estudo da fertilidade das proles

A Tabela 16 e Figura 21 e a Tabela 17 e Figura 22 mostram, respectivamente, os parâmetros observados no estudo da fertilidade da prole feminina e da prole masculina com PN 100, cujas mães foram tratadas, do DG 06 ao PN 07, com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados da *S. lycocarpum*. Os ratos do grupo controle emprenharam 25 de um total de 36 ratas e os machos experimentais emprenharam 26 de um total de 36 ratas. Todas as ratas prenhes levaram a gestação a termo.

A ANOVA de duas entradas revelou não haver alterações provenientes dos fatores tratamento e sexo, nem interação entre estes dois fatores, nos parâmetros tempo para emprenhar, ganho de peso total das ratas prenhes, peso das ninhadas, número e peso dos fetos fêmeas e machos, peso das placentas dos fetos fêmeas e machos, número total de implantações, número total de reabsorções, porcentagem de fetos vivos e nas taxas de implantação e de perdas pré- e pós-implantação. O teste “t” revelou menor número de corpos lúteos no ovário direito [$t=2,461$; $F(1/14)=1,117$ e $p=0,0286$], menor taxa de perda pós-implantação [$t=2,046$; $F(1/14)=3,384$ e $p=0,0308$] e maior porcentagem de fetos vivos [$t=2,004$; $F(1/14)=3,212$ e $p=0,0332$] nas fêmeas experimentais; e peso corporal aumentado [$t=2,176$; $F(1/49)=5,465$ e $p=0,0316$] na prole masculina obtida dos machos experimentais analisados.

Tabela 16 – Parâmetros avaliados no estudo da fertilidade realizada em fêmeas adultas (PN 100) cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-DG 22) e lactação (PN 01 - PN 07) com ração contendo 10% de frutos verdes e moídos de *S. lycocarpum*. São apresentados as médias e os respectivos erros padrão (n=8/grupo).

Parâmetros	Controle	Experimental
Tempo para emprenhar (dias)	3,250 ± 0,6478	2,714 ± 0,2857
Ganho de peso total (g) das mães na gestação	86,875 ± 5,746	88,286 ± 5,070
Peso do ovário esquerdo (g)	0,0736 ± 0,007	0,0827 ± 0,006
Peso do ovário direito (g)	0,0660 ± 0,005	0,0707 ± 0,005
Peso do útero (g)	3,930 ± 0,0247	3,868 ± 0,1255
Peso das ninhadas (g)	32,413 ± 3,123	35,543 ± 3,028
Número de filhotes por ninhada	9,625 ± 0,9808	10,143 ± 0,634
Peso de fetos fêmeas (g)	3,375 ± 0,1191	3,557 ± 0,4264
Peso de fetos machos (g)	3,500 ± 0,1350	3,843 ± 0,4700
Peso das placentas de fetos fêmeas (g)	0,5625 ± 0,032	0,5571 ± 0,020
Peso das placentas de fetos machos (g)	0,5500 ± 0,038	0,5857 ± 0,034
Número de fetos fêmeas	4,750 ± 0,7734	6,143 ± 0,9368
Número de fetos machos	4,875 ± 0,6391	4,000 ± 0,6901
Número de corpos lúteos no ovário direito	7,250 ± 0,5590	5,286 ± 0,5654*
Número de corpos lúteos no ovário esquerdo	7,625 ± 1,5580	6,143 ± 0,4592
Número de implantações no corno uterino direito	5,875 ± 0,7181	4,857 ± 0,5533
Número de implantações no corno esquerdo	5,875 ± 0,5806	5,714 ± 0,5216
Número de reabsorções	0,3750 ± 0,183	0,2857 ± 0,184
Taxa de perda pré-implantação	19,888 ± 9,397	7,857 ± 3,2720*
Taxa de perda pós-implantação	12,525 ± 3,059	5,000 ± 1,7780
Taxa de implantação	80,113 ± 9,397	92,143 ± 3,272
Porcentagem de fetos vivos	84,475 ± 3,059	94,886 ± 1,825*

* p < 0,05 – teste “t” de Student.

Figura 21 – Estudo da fertilidade de ratas fêmeas em idade adulta (PN 100) cujas mães foram ou não (controle) tratadas durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* (* $p < 0,05$ – teste “t”).

M= machos; F= fêmeas; O.E.= ovário esquerdo; O.D.= ovário direito; n° C.L. OD= n° de corpos lúteos no ovário direito; n° C.L. OE= n° de corpos lúteos no ovário esquerdo; n° I.C.U.D.= n° de implantações no corno uterino direito; n° I.C.U.E.= n° de implantações no corno uterino esquerdo; TPprél (%)= taxa de perda pré-implantação; TPpós (%)= taxa de perda pós-implantação; TI (%)= taxa de implantação; %FV= percentagem de fetos vivos.

Tabela 17 – Parâmetros avaliados no estudo da fertilidade realizada com machos adultos (PN 100) cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-DG 22) e lactação (PN 01-PN 07) com ração contendo 10% de frutos verdes e moídos de *S. lycocarpum*. São apresentados as médias e respectivos erros padrão.

Parâmetros	Controle (n=25)	Experimental (n=26)
Número de ratas iscas que emprenharam	3,250 ± 0,2500	3,250 ± 0,3660
Tempo para emprenhar (dias)	3,9623 ± 0,553	3,923 ± 0,4990
Peso corporal das iscas no dia DG21 (g)	327,12 ± 4,954	334,69 ± 5,190
Ganho de peso total (g) das iscas na gestação	89,192 ± 3,865	93,615 ± 4,065
Peso das ninhadas (g)	31,915 ± 1,943	33,580 ± 2,572
Número de fetos total	9,385 ± 0,5740	9,269 ± 0,6216
Número de fetos fêmeas	4,269 ± 0,3944	4,423 ± 0,4267
Número de fetos machos	5,115 ± 1,4814	4,808 ± 0,4675
Peso corporal de fetos fêmeas (g)	3,412 ± 0,0459	3,540 ± 0,0922
Peso corporal de fetos machos (g)	3,496 ± 0,0474	3,758 ± 0,1087*
Peso das placentas de fetos fêmeas (g)	0,5615 ± 0,020	0,5520 ± 0,018
Peso das placentas de fetos machos (g)	0,5520 ± 0,015	0,5885 ± 0,022
Número total de implantações	10,731 ± 0,583	10,500 ± 0,666
Número de reabsorções	2,375 ± 1,1170	3,500 ± 1,4520
Taxa de perda pré-implantação	12,862 ± 3,193	17,665 ± 4,683
Taxa de perda pós-implantação	12,723 ± 3,978	11,896 ± 2,860
Taxa de implantação	87,138 ± 3,193	82,373 ± 4,687
Porcentagem de fetos vivos	83,427 ± 5,167	88,104 ± 2,860

* p < 0,05 –teste “t” de student

Figura 22 – Estudo da fertilidade de ratos machos em idade adulta (PN 100) cujas mães foram ou não (controle) tratadas durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* (* $p < 0,05$ - teste “t” de student).

nº RP= nº de ratas prenhes; TPE= tempo para engravidar; NFF= nº de filhotes total; NFM= nº de filhotes fêmeas; NFM= nº de filhotes machos; PFM= peso de filhotes fêmeas; PFM= peso de filhotes machos; GP= ganho de peso das mães durante a gestação; PN= peso das ninhadas; nº I= nº de implantações; nº R= nº de reabsorções; TPprél (%)= taxa de perda pré-implantação; TPpós (%)= taxa de perda pós-implantação; TI (%)= taxa de implantação; %FV= percentagem de fetos vivos.

6.8 Dosagem hormonal

6.8.1 Níveis séricos dos hormônios tireoideanos

A Tabela 18 e a Figura 23 apresentam as concentrações séricas dos hormônios T3 (ng/ml) e T4 (µg/ml) na prole (PN90) de ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação e lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*.

A ANOVA de duas entradas revelou alterações provenientes dos fatores tratamento e sexo, sem interação entre os fatores, nas concentrações séricas de T3. Os machos experimentais apresentaram concentrações reduzidas do hormônio T3 quando comparados com os machos do grupo controle [$F(1/19)=2,142$; $p<0,05$]. Dimorfismo sexual também foi observado uma vez que as fêmeas mostraram níveis mais elevados deste hormônio que os machos [$F(1/19)=5,732$; $p=0,029$]. O teste “t” em seguida aplicado, revelou que, de fato, os machos experimentais apresentaram níveis séricos reduzidos do hormônio T3 quando comparados com os machos do grupo controle [$t=2,005$; $F(1/8)=4,001$; $p=0,04$].

Na avaliação das concentrações séricas do hormônio T4, a ANOVA de duas entradas revelou alterações provenientes dos fatores sexo e tratamento, uma vez que os machos apresentaram níveis séricos de T4 superiores que as fêmeas [$F(1/19)=40,128$; $p<0,001$], e machos experimentais apresentaram menores concentrações séricas de T4 que os machos do grupo controle [$F(1/19)=5,217$; $p=0,036$]. Interação entre os fatores não foi observado. O teste “t” empregado

posteriormente confirmou a menor concentração sérica de T4 em machos experimentais [$t=2,640$; $F(1/8)=1,611$; $p<0,05$).

Tabela 18 – Concentrações séricas dos hormônios tireoideanos T3 - triiodotironina (ng/ml) e T4 - tiroxina ($\mu\text{g/ml}$) de ratos com 90 dias de idade cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle), durante a gestação e início da lactação, com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos da *S. lycocarpum*. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrões. ($n=5/\text{grupo}$).

Grupos	n	T3 (ng/ml)	T4 ($\mu\text{g/ml}$)
Fêmeas controle	5	82,134 $\pm$ 2,984	2,633 $\pm$ 0,154
Fêmeas experimentais	5	83,552 $\pm$ 4,128	2,889 $\pm$ 0,350
Machos controle	5	79,499 $\pm$ 3,159	4,877 $\pm$ 0,219
Machos experimentais	5	65,335 $\pm$ 6,319*	3,943 $\pm$ 0,278*

* $p < 0,05$ – ANOVA de duas entradas seguida pelo teste “t” de student

Figura 23 – Concentrações séricas dos hormônios tireoideanos T3 (A) e T4 (B) em ratos adultos (PN 90) cujas mães foram ou não tratadas durante a gestação e início da lactação com ração contendo 10% de frutos verdes dessecados e moídos da *S. lycocarpum*. São apresentados as médias e erros padrão (n=5/grupo) (* $p < 0,05$ – teste “t” Student). T3= hormônio triiodotironina; T4= hormônio tiroxina.

6.8.2 Concentrações fecais dos metabólitos dos hormônios sexuais

Os resultados obtidos da validação por paralelismo dos conjuntos diagnósticos comerciais da DPC MEDLAB® em fase sólida para uso em extratos fecais de ratos wistar foram:

- para estradiol: $y = -0,67 + 0,978x$; $R^2 = 0,981$
- para progesterona: $y = 0,605 + 0,96x$; $R^2 = 0,984$
- para testosterona: $y = -3,883 + 1,066x$; $R^2 = 0,978$

Da equação da reta e correlação de linearidade (R^2) obtidos de cada conjunto diagnóstico, certificou-se que os hormônios da espécie estudada estão interagindo com os anticorpos do conjunto diagnóstico de maneira similar ao hormônio usado como padrão. Assim, as concentrações obtidas nas amostras de fezes, mostraram-se confiáveis.

As concentrações dos metabólitos dos hormônios sexuais avaliados nas fezes de ratas durante diferentes períodos da gestação, dias DG 01, DG 07, DG 14 e DG 21, mostram que os animais empregados ($n=2$) apresentaram variabilidade individual muito grande. Porém, comparando-se os valores obtidos por estes animais com os valores obtidos pelas mães ($n=7$) nos dias DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21, observa-se que as concentrações se mostram coerentes e, desta forma, fazem parte de uma mesma população.

As concentrações dos metabólitos dos hormônios sexuais avaliados em fezes durante a gestação (dias 01, 07, 14 e 21) estão representados no Quadro 2 e na Figura 24.

Quadro 2 - Concentração dos metabólitos fecais (valores mínimo e máximo) de hormônios sexuais avaliados durante a gestação de ratas (n=2).

Dias da gestação (DG)	Testosterona (µg/g)	Progesterona (ng/g)	Estradiol (ng/g)
DG 01	138,02 725,22	184,43 1640,74	49,89 107,86
DG 07	332,36 1338,49	283,82 1758,11	57,03 81,12
DG 14	342,90 1608,43	314,01 1839,14	61,59 82,33
DG 21	330,29 2547,04	382,73 2502,12	54,47 66,55

Figura 24 - Representação gráfica da validação fisiológica referente a concentração dos hormônios esteroidais progesterona (A), estradiol (B) e testosterona (C) em fêmeas durante a gestação (dias 01, 07, 14 e 21).

A Tabela 19 e a Figura 25 apresentam as concentrações de metabólitos fecais de estrogênios (ng/g) em ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação e lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* (DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21) e também em suas proles aos PN 30, PN 60 e PN 90. O teste "t" revelou nas mães experimentais, no dia PN 07, menor concentração de metabólitos de estradiol [$t=4,013$ e $p<0,01$] quando comparadas com as mães controle. Na prole a ANOVA de duas vias revelou não haver alterações provenientes do tratamento e do sexo, nem interação entre os dois fatores, nos diferentes dias de análise. Porém, o teste "t" revelou na prole fêmea experimental, com PN 60, maior concentração de metabólitos de estrogênios nas fezes [$t=0,0717$ e $p<0,05$] quando comparada com a prole controle.

A Tabela 20 e a Figura 26 apresentam as concentrações de metabólitos fecais da progesterona (ng/g) em ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação e lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* (DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21) e em suas proles aos PN 30, PN 60 e PN 90. A ANOVA revelou na prole alterações provenientes do fator sexo nas amostras coletadas nos dias PN 60 [$p<0,001$; $F(1/25)=23,029$] e PN 90 [$p=0,005$; $F(1/25)=9,861$], onde as fêmeas apresentaram maior concentração de progestinas fecais em relação aos machos. O teste "t" revelou não haver alterações nas concentrações fecais de progestinas nos diferentes dias de análise nas proles e nas mães.

A Tabela 21 e a Figura 27 apresentam as concentrações de metabólitos fecais da testosterona ($\mu\text{g/g}$) em ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação e lactação com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*

(DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21) e em suas proles aos PN 30, PN 60 e PN 90. A ANOVA revelou na prole alterações provenientes do fator sexo nas amostras coletadas nos dias PN 60 [$p < 0,001$; $F(1/25) = 15,847$] e PN 90 [$p < 0,001$; $F(1/25) = 19,333$], onde os machos apresentaram maior concentração de metabólitos fecais de testosterona em relação às fêmeas. O teste “t” revelou não haver alterações nas concentrações fecais de metabólitos da testosterona na prole e nas mães.

Tabela 19 – Concentração de metabólitos fecais de estrogênios (ng/g) em ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-22) e início da lactação (PN 01-07) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*, nos dias DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21, e em sua prole ao completarem PN 30, PN 60 e PN 90. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão (n=07/grupo).

Grupos	Controle (n=7)	Experimental (n=7)
Mães no dia DG 22 ^a	66,673 ± 5,907	66,329 ± 5,849
Mães no dia PN 01 ^a	66,113 ± 3,024	62,372 ± 3,578
Mães no dia PN 07 ^a	62,924 ± 1,947	48,466 ± 3,032**
Mães no dia PN 21 ^a	42,771 ± 1,873	49,756 ± 7,746
Filhotes fêmeas com PN 30 ^b	34,567 ± 2,771	34,334 ± 1,708
Filhotes fêmeas com PN 60 ^b	50,710 ± 4,319	79,408 ± 7,277*
Filhotes fêmeas com PN 90 ^b	66,996 ± 9,104	57,248 ± 4,698
Filhotes machos com PN 30 ^b	38,787 ± 1,530	41,711 ± 1,719
Filhotes machos com PN 60 ^b	48,182 ± 1,748	46,182 ± 2,149
Filhotes machos com PN 90 ^b	51,000 ± 2,188	49,737 ± 1,693

* p < 0,05; ** p < 0,01 – ^a teste “t” de Student

^bANOVA de duas entradas seguida do teste “t” de Student.

Figura 25 - Concentração de metabólitos de estrogênios em fezes de ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-22) e início da lactação (PN 01-07) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*, nos dias DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21 (A), e em sua prole ao completarem PN 30, PN 60 e PN 90 (B). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

Tabela 20 – Concentração de metabólitos fecais de progestinas (ng/g) em ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-22) e início da lactação (PN 01-07) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*, nos dias DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21, e em sua prole ao completarem PN 30, PN 60 e PN 90. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão (n=07/grupo).

Grupos	Controle (n=7)	Experimental (n=7)
Mães no dia DG 22 ^a	974,5 ± 274,1	823,3 ± 216,9
Mães no dia PN 01 ^a	853,6 ± 129,9	761,3 ± 196,3
Mães no dia PN 07 ^a	560,7 ± 96,4	761,2 ± 204,2
Mães no dia PN 21 ^a	1050,9 ± 260,7	609,1 ± 203,7
Filhotes fêmeas com PN 30 ^b	101,8 ± 16,9	163,6 ± 80,6
Filhotes fêmeas com PN 60 ^b	1039,7 ± 262,3	1108,8 ± 302,3
Filhotes fêmeas com PN 90 ^b	601,7 ± 220,0	636,4 ± 121,4
Filhotes machos com PN 30 ^b	70,0 ± 7,5	64,3 ± 6,7
Filhotes machos com PN 60 ^b	136,6 ± 30,8	124,6 ± 33,8
Filhotes machos com PN 90 ^b	213,3 ± 60,3	184,5 ± 43,9

p > 0,05 – ^a teste “t” de Student

^bANOVA de duas entradas seguida do teste “t” de Student.

Figura 26 - Concentração de progestinas (ng/g) em fezes de ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-22) e início da lactação (PN 01-07) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*, nos dias DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21(A) e em sua prole ao completarem PN 30, PN 60 e PN 90 (B). $p > 0,05$.

Tabela 21 – Concentração de metabólitos fecais de testosterona ($\mu\text{g/g}$) em ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-22) e início da lactação (PN 01-07) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*, nos dias DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21, e em sua prole ao completarem PN 30, PN 60 e PN 90. São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão ($n=07/\text{grupo}$).

Grupos	Controle ($n=7$)	Experimental ($n=7$)
Mães no dia DG 22 ^a	158,65 $\pm$ 27,40	176,08 $\pm$ 81,46
Mães no dia PN 01 ^a	91,43 $\pm$ 22,14	56,55 $\pm$ 23,95
Mães no dia PN 07 ^a	62,38 $\pm$ 10,88	60,64 $\pm$ 26,02
Mães no dia PN 21 ^a	24,78 $\pm$ 9,42	20,06 $\pm$ 9,22
Filhotes fêmeas com PN 30 ^b	6,99 $\pm$ 0,73	5,51 $\pm$ 0,40
Filhotes fêmeas com PN 60 ^b	13,55 $\pm$ 2,21	19,98 $\pm$ 5,28
Filhotes fêmeas com PN 90 ^b	15,51 $\pm$ 2,83	13,81 $\pm$ 1,96
Filhotes machos com PN 30 ^b	9,34 $\pm$ 3,97	5,92 $\pm$ 2,73
Filhotes machos com PN 60 ^b	53,09 $\pm$ 13,46	58,57 $\pm$ 18,17
Filhotes machos com PN 90 ^b	42,30 $\pm$ 11,35	37,82 $\pm$ 5,51

$p > 0,05$ – ^a teste “t” de Student

^b ANOVA de duas entradas seguida do teste “t” de Student.

Figura 27 - Concentração de metabólitos de testosterona ($\mu\text{g/g}$) em fezes de ratas tratadas ou não (grupo controle) durante a gestação (DG 06-22) e início da lactação (PN 01-07) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum*, nos dias DG 22, PN 01, PN 07 e PN 21(A), e em sua prole ao completarem PN 30, PN 60 e PN 90 (B); $P > 0,05$

6.9 Dosagem das neuroaminas cerebrais

A Tabela 22 e Figura 28 apresentam os dados obtidos da análise dos sistemas e das concentrações estriatais de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos em ratos machos e fêmeas adultos, com PN 140, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* durante a gestação e início da lactação. A ANOVA de duas entradas seguida pelo teste “t” revelaram:

- neurotransmissor NOR: a ANOVA de duas entradas revelou que o fator tratamento provocou concentração estriatal reduzida de noradrenalina dos animais do grupo experimental [$p=0,027$; $F(1/23)=5,686$]. Interação entre os fatores tratamento e sexo também foi verificado, onde as fêmeas experimentais apresentaram concentração reduzida de NOR em relação aos machos experimentais e em relação às fêmeas do grupo controle [$p=0,006$; $F(2/23)=9,520$]. O teste “t” revelou reduzida concentração de NOR nas fêmeas experimentais [$t=3,967$; $p=0,0022$; $F(1/10)=274,65$]. Nada foi constatado em machos.
- no neurotransmissor DA: a ANOVA de duas entradas revelou que o tratamento com ração contendo 10% de frutos da *S. lycocarpum* durante a gestação e lactação foi capaz de provocar, na prole experimental adulta, concentração reduzida de DA [$p=0,018$; $F(1/23)=6,686$]. Não foram reveladas alterações pelo fator sexo nem verificado interação entre os dois fatores. O teste “t” revelou redução da dopamina estriatal nas fêmeas [$t=2,881$; $p=0,0164$; $F(1/10)=3,223$] e nos machos [$t=3,141$; $p=0,0105$; $F(1/10)=3,343$] experimentais.

- no neurotransmissor 5-HT: a ANOVA de duas entradas revelou diferenças sexuais (dimorfismo) nos níveis estriatais de 5-HT. Os machos apresentaram concentração aumentada desta substância quando comparado com as fêmeas [$p=0,005$; $F(1/23)=9,951$]. Não foram encontradas alterações provocadas pelo fator tratamento, nem interação entre os dois fatores. O teste "t" revelou não haver alterações.
- no metabólito MHPG: a ANOVA de duas entradas revelou que o fator tratamento provocou concentração reduzida desta substância [$p=0,027$; $F(1/23)=5,686$] no estriato do grupo experimental. Interação entre os fatores tratamento e sexo também foi observado: as fêmeas experimentais apresentaram concentração reduzida de MHPG em relação aos machos experimentais e em relação as fêmeas controle [$p=0,006$; $F(1/23)=9,520$]. Alterações provenientes do fator sexo não foram encontradas. O teste "t" revelou nível estriatal reduzido de MHPG em machos experimentais [$t=2,562$; $p=0,0283$; $F(1/10)=3,736$]. A mesma análise revelou não haver alterações nos níveis de MHPG das fêmeas.
- no metabólito HVA: a ANOVA de duas entradas revelou, no fator tratamento, concentração reduzida desta substância no estriato do grupo experimental [$p=0,015$; $F(1/23)=7,058$]. Não foram observadas alterações provenientes do fator sexo, nem interação entre os dois fatores. O teste "t" revelou reduzida concentração estriatal de HVA nas fêmeas experimentais [$t=2,516$; $p=0,0306$; $F(1/10)=4,260$].
- no metabólito VMA: a ANOVA de duas entradas revelou, no fator tratamento, reduzida concentração desta substância no estriato do grupo experimental

[$p=0,011$; $F(1/23)=7,890$]. O teste "t" revelou concentração reduzida de VMA estriatal nos machos experimentais [$t=3,745$; $p=0,0038$; $F(1/10)=3,055$]. Não foram encontradas alterações significativas entre as fêmeas experimentais e controles.

- no metabólito DOPAC: a ANOVA de duas entradas revelou, no fator tratamento, concentração reduzida de DOPAC no estriato dos animais do grupo experimental [$p=0,008$; $F(1/23)=8,543$]. Não houve interação entre os dois fatores. O teste "t" revelou redução significativa deste metabólito em machos [$t=3,547$; $p=0,0260$; $F(1/10)=7,277$] e fêmeas [$t=2,426$; $p=0,0357$; $F(1/10)=1,251$] experimentais.

- no metabólito 5-HIAA: a ANOVA de duas entradas revelou não haver alterações nos fatores tratamento e sexo, porém revelou a ocorrência de interação entre os dois fatores, uma vez que as fêmeas experimentais apresentaram reduzida concentração dos níveis de 5HIAA em relação às fêmeas do grupo controle [$p=0,024$; $F(1/23)=5,985$]. O teste "t" de Student revelou reduzidos níveis estriatais de 5-HIAA nas fêmeas do grupo experimental [$t=2,556$; $p=0,0286$; $F(1/10)=1,823$]. Nenhuma alteração foi constatada nos machos.

- no sistema dopaminérgico: a ANOVA de duas entradas revelou que a relação DOPAC/DA, ou seja, a atividade do sistema dopaminérgico, não foi alterada pelos fatores tratamento e sexo. O teste "t" também revelou não haver alterações na atividade do sistema dopaminérgico estriatal nas fêmeas e nos machos experimentais.

- no sistema noradrenérgico: a ANOVA de duas entradas revelou alterações na atividade do sistema noradrenérgico (VMA/NOR) nos fatores tratamento [$p=0,043$; $F(1/23)=4,649$] e sexo [$p=0,009$; $F(1/23)=8,267$], com interação [$p<0,001$;

$F(1/23)=28,642$]. O tratamento com os frutos verdes promoveu maior atividade do sistema noradrenérgico, uma vez que os animais experimentais apresentaram maior relação VMA/NOR do que os animais do grupo controle. Da mesma forma, as fêmeas apresentaram maior atividade do sistema noradrenérgico. O teste "t" de Student revelou, no estriato de fêmeas experimentais, maior atividade do sistema noradrenérgico [$t=6,519$; $F(1/10)=3,117$ e $p<0,0001$].

- no sistema serotoninérgico: a ANOVA de duas entradas revelou que apenas o fator sexo promoveu alterações na relação 5-HIAA/5-HT dos animais [$p=0,032$; $F(1/23)=5,347$], onde as fêmeas mostraram maior atividade do sistema serotoninérgico. O fator tratamento não provocou alterações e não houve interação entre os dois fatores. O teste "t" revelou não haver alterações na relação 5-HIAA/5-HT em machos e fêmeas do grupo experimental.

Tabela 22 – Concentração (ng/g) no estriato de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos MHPG, HVA, VMA, DOPAC e 5-HIAA, e atividade dos sistemas em ratos machos e fêmeas adultos, com PN 140, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* durante a gestação (DG 06-22) e lactação (PN 01-07). São apresentadas as médias e os respectivos erros padrão (n=06/grupo).

	Fêmeas		Machos	
	Controle (n=6)	Experimental (n=6)	Controle (n=6)	Experimental (n=6)
NOR	315,56 ± 66,297	52,090 ± 4,000*	274,95 ± 47,114	247,13 ± 38,016
DA	5275,1 ± 236,19	3876,8 ± 424,05*	6763,4 ± 659,45	4402,6 ± 360,68*
5-HT	527,24 ± 120,01	435,46 ± 68,128	939,90 ± 115,23	648,01 ± 93,431
MHPG	196,84 ± 35,240	136,95 ± 24,156*	199,66 ± 25,651	125,68 ± 13,271*
HVA	397,43 ± 38,156	290,76 ± 18,487*	517,10 ± 51,271	300,46 ± 37,542*
VMA	249,07 ± 49,412	177,26 ± 14,261	423,12 ± 30,413	193,75 ± 53,157*
DOPAC	486,40 ± 31,273	384,62 ± 27,959*	615,73 ± 64,945	370,08 ± 24,076*
5-HIAA	876,43 ± 74,388	556,94 ± 100,43*	844,92 ± 105,39	709,57 ± 42,456
VMA/NOR	1,086 ± 0,31998	3,416 ± 0,1762***	1,855 ± 0,45547	0,8633 ± 0,22370
DOPAC/DA	0,0927 ± 0,0064	0,1042 ± 0,01174	0,0918 ± 0,0051	0,0848 ± 0,00259
5-HIAA/5-HT	1,9700 ± 0,3654	1,3940 ± 0,32310	0,9081 ± 0,0475	1,2210 ± 0,21210

*p <0,05; **p<0,01; ***p<0,001 – ANOVA de duas entradas seguida do teste “t” de Student.

NOR= noradrenalina; DA= dopamina; 5-HT= serotonina; MHPG=3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; HVA=ácido homovanílico; VMA=ácido vanilmandélico; DOPAC= ácido 3,4 di-hidroxifenilacético; 5-HIAA= ácido 5-hidroxiindolacético

Figura 28 - Análise dos sistemas e dos níveis estriais de noradrenalina, dopamina, serotonina e seus respectivos metabólitos (ng/g) em ratos machos e fêmeas adultos, com PN 140, cujas mães foram tratadas ou não com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* durante a gestação e início da lactação.

*p <0,05; **p<0,01; ***p<0,001

A Tabela 23 e Figura 29 apresentam os dados obtidos da análise dos sistemas e das concentrações de noradrenalina, dopamina, serotonina e seus respectivos metabólitos no hipotálamo de ratos machos e fêmeas adultos, com PN 140, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* durante a gestação e início da lactação. A ANOVA de duas entradas e o teste "t" revelaram:

- no neurotransmissor NOR: a ANOVA de duas entradas revelou alterações nos fatores tratamento e sexo. O tratamento provocou concentração reduzida de NOR no grupo experimental [$p=0,006$; $F(1/23)=9,464$]. O fator sexo mostrou que as fêmeas apresentaram reduzida concentração de NOR em relação aos machos [$p=0,004$; $F(1/23)=10,655$]. O teste "t" revelou reduzida concentração de NOR em machos experimentais [$t=4,044$; $p=0,0022$; $F(1/10)=6,123$]. Não foram reveladas alterações nas fêmeas.
- o neurotransmissor DA e seu metabólito DOPAC não foram mensurados, porque o hipotálamo apresenta apenas traços destas substâncias, impedindo suas dosagens (valores abaixo do limite de detecção do sistema).
- no neurotransmissor 5-HT: a ANOVA de duas entradas revelou, no fator tratamento, concentração aumentada de serotonina no grupo experimental [$p=0,021$; $F(1/23)=6,331$]. O teste "t" revelou não haver alterações significantes.
- no metabólito MHPG: a ANOVA de duas entradas revelou, no fator sexo, alterações nas concentrações de MHPG. As fêmeas apresentaram reduzida concentração deste metabólito quando comparadas com os machos [$p=0,016$;

F(1/23)=6,935]. O fator tratamento revelou não alterar os níveis de MHPG. Não se observou interação entre os dois fatores. O teste "t" revelou não haver alterações.

- no metabólito HVA: a ANOVA de duas entradas revelou, no fator tratamento, redução de HVA no grupo experimental [p=0,001; F(1/23)=13,669]. Não se verificou dimorfismo sexual, mas interação entre os dois fatores – tratamento e sexo – foi observado. As fêmeas e machos [p=0,004; F(1/23)=10,238] experimentais mostraram reduzida concentração de HVA. O teste "t" revelou reduzida concentração de HVA em machos experimentais [t=2,930; p=0,0067; F(1/10)=1,865]. Não foram observadas alterações nas fêmeas.

- no metabólito VMA: a ANOVA de duas entradas revelou, nos fatores tratamento e sexo, sem interações, alterações nos níveis hipotalâmicos do metabólito VMA. O tratamento provocou reduzida concentração de HVA no grupo experimental [p=0,001; F(1/23)=14,461]. O sexo revelou que as fêmeas apresentam reduzida concentração deste metabólito quando comparado com os machos [p=0,020; F(1/23)=6,438], indicando a presença de dimorfismo sexual. O teste "t" constatou reduzida concentração de VMA em machos experimentais [t=2,554; p=0,0287; F(1/10)=3,673]. Não foram reveladas alterações nas fêmeas.

- no metabólito 5-HIAA: a ANOVA de duas entradas e o teste "t" revelaram não haver alterações nos níveis hipotalâmicos de 5-HIAA.

- no sistema noradrenérgico: a ANOVA de duas entradas e o teste "t" revelaram não haver alterações na razão VMA/NOR. Não foram encontradas alterações provenientes de dimorfismo sexual nem interação entre os fatores tratamento e sexo.

- no sistema serotoninérgico: a ANOVA de duas entradas revelou, no fator sexo, alterações no sistema [$p=0,050$; $F(1/23)=9,757$]. Ocorreu interação entre os dois fatores [$p=0,048$; $F(1/23)=4,442$]. Os machos revelaram maior atividade no sistema serotoninérgico que as fêmeas. A interação revelou que os machos experimentais possuem atividade aumentada no sistema serotoninérgico quando comparados com as fêmeas experimentais e atividade reduzida quando comparados com os machos do grupo controle. O teste “t” revelou que as fêmeas experimentais [$t=2,765$; $p=0,020$; $F(1/10)=1,296$] apresentam razão 5-HIAA/5-HT reduzida. O mesmo teste não revelou alterações nos machos.

Tabela 23 – Concentrações (ng/g) hipotalâmicas de NOR, DA, 5-HT e seus respectivos metabólitos MHPG, HVA, VMA, 5-HIAA e DOPAC e atividades dos sistemas em ratos machos e fêmeas adultos com PN 140, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* durante a gestação (DG 06-22) e lactação (PN 01-07). São apresentadas as médias e respectivos erros padrão (n=06/grupo).

	Fêmeas		Machos	
	Controle	Experimental	Controle	Experimental
	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)
NOR	1809,5 ± 243,71	1470,5 ± 158,56	1503,8 ± 187,18	387,31 ± 75,646**
5-HT	218,20 ± 98,172	344,22 ± 46,588*	217,81 ± 25,770	173,29 ± 13,983
MHPG	304,63 ± 37,183	225,27 ± 14,970	267,82 ± 42,748	171,71 ± 31,719
HVA	226,13 ± 34,969	215,60 ± 26,327	213,73 ± 23,242	143,54 ± 5,8250*
VMA	220,02 ± 22,483	178,12 ± 25,038	151,36 ± 22,706	85,957 ± 11,847*
5-HIAA	218,95 ± 34,339	288,82 ± 41,479	231,19 ± 19,365	196,85 ± 11,342
VMA/NOR	0,1402 ± 0,0289	0,1267 ± 0,0216	0,1017 ± 0,0125	0,1321 ± 0,0247
5-HIAA/5-HT	1,0340 ± 0,0526	0,8404 ± 0,0462*	1,0940 ± 0,0844	1,1490 ± 0,0435

*p <0.05; **p<0,01 – ANOVA de duas entradas seguida do teste “t”.

NOR= noradrenalina; 5-HT= serotonina; MHPG=3-metoxi-4-hidroxifenilglicol;

HVA=ácido homovanílico; VMA=ácido vanilmandélico;

5-HIAA= ácido 5-hidroxiindolacético

Figura 29 - Análise dos sistemas e das concentrações hipotalâmicas de noradrenalina, dopamina, serotonina e seus respectivos metabólitos (ng/g) em ratos machos e fêmeas adultos, com PN 140, cujas mães foram tratadas ou não (grupo controle) com ração contendo 10% de frutos verdes da *S. lycocarpum* durante a gestação e início da lactação

*p < 0.05; **p < 0.01

Discussão

7. Discussão

Análises fitoquímicas dos frutos da *S. lycocarpum* já foram anteriormente realizadas (MOTIDOME et al., 1970; HARAGUCHI et al., 1978; DALL'AGNOL e von POSER, 2000) em razão do interesse na extração de solasodina pela indústria farmacêutica, uma vez que esta substância pode ser empregada como matéria prima básica para a produção de medicamentos contraceptivos e corticóides.

Nos estudos fitoquímicos anteriormente realizados, frações brutas de alcalóides, resultantes da extração dos frutos da *S. lycocarpum*, foram submetidas a CCD, sendo que flavonóides, taninos, alcalóides e esteróides foram primeiramente detectados. Em seguida, a aglicona esteroidal solasodina e seus respectivos glicoalcalóides, solamargina e solasonina, foram identificados. Num estudo com frutos colhidos em Curitiba-PR observou-se que a *S. lycocarpum* da região apresentou 0,26% de solasodina (KERBER et al., 1993). Análise de frutos colhidos no Distrito Federal mostraram rendimento de até 1% de solasodina, após hidrólise ácida da fração de alcalóides totais obtida pelo processo de extração dos frutos (MOLA et al., 1997). No presente estudo, realizado com os frutos colhidos em Itajubá-MG, observou-se um rendimento de 1,78% de alcalóides brutos totais nos frutos dessecados, dos quais aproximadamente 0,105% corresponde à solamargina e 0,155% corresponde à solasonina. Assim, nos frutos verdes não dessecados são encontrados 0,021% de solamargina e 0,031% de solasonina.

Após a extração, a identificação por CCD e o isolamento da solamargina e solasonina presentes nos frutos verdes da *S. lycocarpum* aqui empregados, foi também realizada a confirmação dos dois glicoalcalóides por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN) e carbonos (^{13}C RMN). Os espectros resultantes corroboraram com os obtidos por outros autores ao identificarem estas mesmas estruturas por ressonância magnética nuclear em diferentes espécies de *Solanum* (MAHATO et al., 1980; FUKUHARA e KUBO, 1991).

Além da constatação da presença dos glicoalcalóides solamargina e solasonina nos frutos verdes da *S. lycocarpum*, estes foram dessecados, moídos, misturados em ração a 10% e administrados a ratas prenhes, no período que corresponde os dias DG 06 ao PN 07, que envolve a organogênese, o desenvolvimento fetal e a primeira semana de vida pós natal da prole, período em que os hormônios sexuais atuam potentemente no organismo de ratos filhotes, promovendo a diferenciação sexual.

Sabe-se que o peso corporal é analisado em experimentos *in vivo* com o objetivo de avaliar possíveis efeitos tóxicos sobre o organismo como um todo. Já o peso de órgãos e observação macroscópica minuciosa, tomam possível avaliar efeitos tóxicos específicos sobre algum sistema (MANSON e KANG, 1994), o que facilita a compreensão do mecanismo de ação da substância alvo. No presente estudo, os resultados obtidos indicam que a ingestão diária de frutos verdes da *S. lycocarpum*, a 10% na ração, por ratas prenhes do DG 06 ao PN 07, provocou leve toxicidade materna, uma vez que menor peso corpóreo e menor ganho de peso foram observados, durante todo o período de administração, nas mães tratadas, sem a constatação de importantes alterações no consumo de ração e na

ingestão hídrica. Alterações histopatológicas em tecidos e no peso de órgãos das mães experimentais não foram encontradas, mostrando que os frutos verdes da *S. lycocarpum* provocam leves efeitos tóxicos se consumidos durante a gestação. De fato, essa hipótese é reforçada ao avaliar-se o desempenho reprodutivo das mães experimentais que se mostrou semelhante ao desempenho das mães do grupo controle. Assim, pode-se sugerir que a ingestão de frutos verdes da *S. lycocarpum*, a 10% na ração, durante a gestação e início da lactação, não altera a gestação propriamente dita. Porém, o tratamento mostrou-se levemente fetotóxico, uma vez que promoveu redução do desenvolvimento fetal ainda no útero, constatado pelo reduzido peso das ninhadas ao nascimento, pelo reduzido comprimento corporal dos filhotes ao nascimento, pela presença de um ou no máximo dois natimortos em 20% das ninhadas das mães tratadas e pelo menor ganho de peso corporal da prole exposta na primeira semana de vida.

Da mesma forma, MARUO et al. (2003b), empregando ratas prenhes que foram tratadas durante a organogênese com ração contendo 3% de frutos verdes da *S. lycocarpum*, constataram discreta toxicidade materna, uma vez que alterações no peso e ganho de peso, e nos demais parâmetros acima mencionados não foram encontrados nas mães. Provavelmente, a ausência de toxicidade materna relatada por MARUO et al. (2003b) seja consequência não só da menor concentração da planta na ração, como também do menor tempo de exposição, quando comparados com os resultados obtidos no presente estudo.

A habilidade de manter a gestação à termo foi avaliada em estudos onde ratas prenhes foram tratadas durante a implantação (PETERS et al., 2001) e durante o desenvolvimento fetal (CHANG et al., 2002) com o “polvilho da lobeira”,

preparação fitoterápica hipoglicemiante de uso humano, obtida a partir dos frutos verdes da planta, não sendo observada nenhuma alteração. Ainda, ratas tratadas apenas durante a lactação com o “polvilho da lobeira” não mostraram qualquer toxicidade materna nem alteração comportamental para com a ninhada, que se mostrou fisicamente normal durante seu desenvolvimento (MOTTA et al., 2002b).

Sabe-se que o estrogênio, se administrado a mães lactantes, interrompe a síntese e a secreção de leite (SILVA e VASCONCELOS, 1988). No mesmo sentido, certas plantas que possuem fitoestrógenos, como as plantas da família Verbanaceae, apresentam a capacidade de reduzir ou inibir a produção de leite (SAWAGADO e HOUEBINE, 1988; CHEN et al., 1995). Assim, no presente estudo, o menor ganho de peso corporal verificado na prole exposta na primeira semana pós-natal, período da lactação em que a administração dos frutos foi mantida, pode ser resultante de uma possível ação estrogênica que os glicoalcalóides presentes na planta poderiam promover, reduzindo a produção de leite da rata e, como consequência, reduzindo o peso e o ganho de peso corporal da prole na primeira semana de vida (Tabelas 6 e 7). Por outro lado, o peso e o ganho de peso das proles experimentais manteve-se menor até a idade adulta, indicando que estas alterações não podem ser atribuídas somente à menor produção de leite.

O tamanho e peso dos filhotes ao nascimento são variáveis importantes que podem alterar o desenvolvimento físico dos animais (LEONARD, 1982). Além disso, o crescimento e desenvolvimento normal do feto depende de uma série de fatores: endocrinológicos, imunológicos e nutricionais. O feto necessita de glicose, e, uma vez que, *a priori*, quase não realiza a gliconeogênese, é bastante

dependente da glicose materna. Se os frutos e o fitoterápico obtido dos frutos da *S. lycocarpum* são usados popularmente como hipoglicemiantes (DALL'AGNOL e von POSER, 2000), pode-se especular que essa possível ação farmacológica possa realmente reduzir a taxa de glicose no sangue das mães durante a gestação, promovendo menor estatura corpórea ao nascimento, e menor peso e ganho de peso dos filhotes do nascimento à vida adulta, como constatados no presente estudo. Outras hipóteses podem ser consideradas: a suposta habilidade dos glicoalcalóides esteroidais solamargina e solasonina ligarem-se a receptores da membrana celular de células susceptíveis, provocando a perda da integridade e da função da membrana e da própria célula (RODDICK et al., 2001); e a capacidade de inibirem a conversão enzimática do lanosterol ao colesterol quando a solasodina atravessa passivamente a membrana de células alvo, após a ligação das trioses aos receptores específicos na membrana celular (KUSANO et al., 1987).

GUERRA et al. (1997), administrando um extrato aquoso obtido a partir dos frutos verdes da *S. lycocarpum* durante a organogênese de ratos, observaram redução do peso corpóreo e do peso do fígado em filhotes machos aos 20 dias de vida. Por outro lado, no presente estudo, no qual usou-se os frutos na ração em período de exposição superior, os filhotes experimentais apresentaram algumas oscilações na razão peso de órgãos/peso corporal em diferentes momentos; essas alterações foram consideradas de natureza reversível, uma vez que nada se observou quando os animais atingiram a vida adulta (PN 60 e PN 90).

O alcalóide esteroide solasodina e os glicoalcalóides solamargina e solasonina, presentes nos frutos da *S. lycocarpum*, são compostos derivados do

metabolismo de algumas plantas que estruturalmente ou funcionalmente mimetizam estrogênios, como fazem os fitoestrógenos (OSOSKI e KENELLY, 2003). O desenvolvimento e a atividade da vesícula seminal, testículos e epidídimos, são androgênio-dependentes e a redução de seus pesos significa, em geral, redução dos níveis de testosterona circulante e atrofia dos respectivos órgãos (LUKE e COFFEY, 1994). No presente estudo constatou-se importante degeneração de células germinativas (espermatozóides) e vacúolos nos ductos testiculares dos machos experimentais aos PN 60 e 90, indicando possível prejuízo na espermatogênese (FOLEY, 2001), porém não se constatou alterações importantes no peso dos mesmos. Por outro lado, foi observado na prole fêmea experimental discreta degeneração nas células epiteliais uterinas aos 60 dias de vida (PN 60). Esta lesão mostrou-se reversível, uma vez que não foram constatadas alterações nas células uterinas aos 90 dias de vida. Estes achados em machos e fêmeas podem ser atribuídos aos efeitos hormonais dos princípios ativos contidos na planta. Contudo, deve ser ressaltado que as alterações encontradas nas células epiteliais uterinas podem também ser atribuídas ao momento do ciclo estral em que as fêmeas encontravam-se quando submetidas a eutanásia, e não aos efeitos dos glicoalcalóides presentes na planta, uma vez que não foi constatada a fase do ciclo estral no dia da eutanásia.

Para a avaliação dos possíveis efeitos hormonais da planta na esfera reprodutiva foi estudado o comportamento sexual e a fertilidade das proles adultas. Nos machos experimentais não foram observadas alterações no comportamento sexual e nas fêmeas experimentais observou-se reduzido coeficiente de lordose. Assim, sabe-se que os hormônios sexuais gonadais são

fundamentais para o desenvolvimento embrionário e a diferenciação sexual adequados (MCCLUSKY e NAFTOLIN, 1981). É sabido que os hormônios esteroidais (especialmente a testosterona) possuem papel importante em embriões de fetos machos, cujos efeitos se estendem dos últimos dias da gestação (DG 18) ao 10º dia pós-natal, possibilitando a masculinização e defeminização do cérebro, por alterações estruturais e neuroquímicas no cérebro em desenvolvimento. Isto não ocorre no cérebro de fetos fêmeas, uma vez que não são expostas a esteróides, e assim seus cérebros permanecem femininos (MCCLUSKY e NAFTOLIN, 1981). Sabe-se também que a solasodina atravessa a membrana celular passivamente (KUSANO et al., 1987) e, uma vez no interior das células, poderá exercer efeitos hormonais, prejudicando assim o comportamento sexual das fêmeas em idade adulta, sem alterar o comportamento sexual dos machos, por estar presente no cérebro dos fetos neste período crítico de diferenciação sexual. Sabe-se também que um desregulador endócrino, por ação anti-androgênica e/ou anti-estrogênica, altera a masculinização hipotalâmica, reduzindo o comportamento sexual de ratos machos; por ação estrogênica, favorece a masculinização hipotalâmica de ratas fêmeas, reduzindo o comportamento de lordose durante a atividade sexual, e promovendo alterações estruturais nos ductos testiculares de machos (MCCLUSKY e NAFTOLIN, 1981). Assim, pode-se especular a respeito da possível ação estrogênica do alcalóide solasodina, presente nos frutos da *S. lycocarpum*, pelos efeitos provenientes da exposição indireta de fetos e neonatos que foram aqui observados (isto é, redução do coeficiente de lordose e degeneração dos ductos testiculares).

Sabe-se que o estímulo provocado por uma fêmea receptiva promove no macho a ativação de três principais sistemas que integram a motivação e o desempenho sexual de machos: o sistema pré-óptico medial (que atua sobre a resposta genital dos machos), o sistema mesolímbico (que atua sobre o apetite e motivação sexual) e o sistema nigroestriatal (que atua sobre a eficiência copulatória). Sabe-se também que hormônios esteroidais facilitam esse processo (HULL et al., 1999). A região medial pré-óptica hipotalâmica modula os efeitos dos hormônios esteroidais sexuais através de projeções descendentes que cruzam a área medial cortical chegando a várias áreas no interior do cérebro. Desta forma, a região medial pré-óptica se encontra conectada a regiões cerebrais que, como ela, possuem grande número de células receptoras de esteróides. Apesar das conexões sugerirem que estas áreas interagem fortemente entre si, lesões em várias delas não produz alterações no comportamento sexual de machos (HART e LEEDY, 1985). Esta plasticidade poderia também explicar, ao menos em parte, a ausência de alterações no comportamento sexual da prole masculina experimental, observada no presente estudo.

O comportamento sexual de ratas fêmeas é modulado por três fatores: atratividade (características físicas da fêmea capazes de atrair a atenção do macho, aumentando a probabilidade do acasalamento), proceptividade (atitudes que mostram ao macho que a fêmea está em fase reprodutiva, como pulos e corridas rápidas) e receptividade (se refere ao reflexo de lordose, necessário para a cópula – BEACH, 1976). O coeficiente de lordose, parâmetro usualmente empregado na avaliação do comportamento sexual de ratas fêmeas, ocorre na presença de estradiol e progesterona. A área medial basal do hipotálamo, em

particular o núcleo ventromedial hipotalâmico (VMN) e a área pré-óptica (POA), mostram-se decisivos para regular e manter os efeitos dos esteróides sexuais, promovendo assim, o comportamento de lordose (RUBIN e BARFIELD, 1980). Além disso, sabe-se que implantações de testosterona ou estradiol na área medial basal hipotalâmica diminui ou elimina a resposta de lordose a hormônios esteroidais em fêmeas adultas (NADLER, 1968; CHRISTENSEN e GORSKI, 1978). Os glicoalcalóides esteroidais presentes na *S. lycocarpum* poderiam ter desregulado o sistema endócrino, uma vez que no período fetal substâncias esteroidais não são encontradas no cérebro de fetos fêmeas (INSEL, 1995). Além disso, sabe-se que substâncias semelhantes a hormônios sexuais administradas a ratas fêmeas filhotes, na primeira semana pós-natal, provocam sensibilidade alterada à subseqüentes esteróides gonadais, promovendo masculinização (presença de comportamento de monta de machos) e defeminização (reduzido comportamento de lordose) após a puberdade (INSEL, 1995).

O desenvolvimento do sistema nervoso de mamíferos pode ser resumido em quatro processos: neurogênese (nascimento e proliferação de neurônios), migração, formação de sinapses e mielinização. A neurogênese é predominantemente um evento pré-natal, entretanto em algumas regiões cerebrais os neurônios são gerados no cérebro após o nascimento dos mamíferos (INSEL, 1995). Neurônios monoaminérgicos, tais como noradrenalina e serotonina, são formados logo no início do desenvolvimento neural (JACOBSON et al., 1985). No presente estudo, atividade aumentada do sistema noradrenérgico estriatal, acompanhado por reduzidas concentrações de NOR e níveis normais de VMA, foram observados nas fêmeas experimentais, mostrando que, de fato, o

neurotransmissor NOR está reduzido no estriato. Ao contrário, os machos experimentais não mostraram alterações no sistema noradrenérgico hipotalâmico, mesmo na presença de níveis reduzidos de NOR e VMA. Os níveis de DA e DOPAC estriatais mostraram-se diminuídos em machos e fêmeas experimentais. Entretanto, o sistema dopaminérgico estriatal não mostrou-se com atividade alterada quando comparado com aquele de ratos controle. As fêmeas experimentais ainda apresentaram menor atividade do sistema serotoninérgico hipotalâmico quando comparados às fêmeas do grupo controle.

Sabe-se que os neurotransmissores NOR e DA facilitam e a 5-HT prejudica o comportamento sexual de machos e fêmeas (DE VRIES, 1990). As fêmeas experimentais apresentaram níveis reduzidos de NOR no estriato, o que explica, parcialmente, a redução do coeficiente de lordose observado, mesmo na ausência de alterações no sistema dopaminérgico. Menor atividade do sistema serotoninérgico também foi observado no hipotálamo das fêmeas experimentais, mesmo diante de níveis aumentados de 5-HT, corroborando com o reduzido coeficiente de lordose observado. Mesmo frente as alterações neuroquímicas detectadas, os machos experimentais não apresentaram prejuízo no comportamento sexual, mostrando que o pico pré-natal de testosterona no cérebro talvez ofereça alguma resistência aos efeitos de esteróides exógenos, ou que as alterações neuroquímicas encontradas não sejam suficientemente capazes de promover alterações no comportamento sexual.

Em suma, as alterações neuroquímicas encontradas no sistema nervoso central de ratos machos e fêmeas experimentais expostos aos frutos da *S. lycocarpum* (10% na ração), durante a gestação e início da lactação, podem ter

promovido efeitos que prejudicaram o sistema neuroendócrino dos filhotes, promovendo redução do coeficiente de lordose das fêmeas experimentais e degeneração de células germinativas dos ductos testiculares dos machos experimentais. Redução do ganho de peso dos filhotes do nascimento à idade adulta também foi observado. Estes dados em conjunto, sugerem que os glicoalcalóides esteroidais da *S. lycocarpum* por atuarem por vias hormonais, com possível ação estrogênica, talvez promovam alterações neurais no sistema nervoso central de filhotes expostos durante a gestação e/ou lactação. Vale ressaltar ainda que a exposição de ratos adultos a hormônios gonadais esteroidais provoca alterações na concentração dos neurotransmissores cerebrais, o mesmo ocorrendo por exposição durante o desenvolvimento fetal (MCCLUSKY e NAFTOLIN, 1981). O efeito de androgênios aromáticos e estrógenos no cérebro em desenvolvimento parece envolver um estímulo regional de crescimento de neurônios (MCEWEN et al., 1978). Este dado assume particular importância frente a evidência de que a exposição precoce a hormônios gonadais pode atuar promovendo alterações estruturais no sistema nervoso central (MCCLUSKY e NAFTOLIN, 1981). Se o alcalóide presente nos frutos promove no cérebro dos fetos ações semelhantes a de esteróides gonadais, reforça-se a hipótese de que a *S. lycocarpum* é capaz de alterar o desenvolvimento cerebral por vias neuronais, como consequência da ação hormonal que promove.

A fisiologia da reprodução está centrada no eixo hipotalâmico-pituitária-gonadal. Este eixo atua possibilitando o desenvolvimento fenotípico do embrião, a maturação sexual na puberdade, a função endócrina dos testículos (produção de testosterona) e a função exócrina dos testículos (produção de espermatozóides e

esperma) (HESS et al., 1997). Ejaculação e emissão de sêmen no trato genital feminino requerem monta, ereção peniana e intromissão efetivos. Estas funções dependem de uma associação de fatores hemodinâmicos e androgênicos, assim como de impulsos nervosos centrais e autonômicos. Interferência em algum desses processos pode reduzir potencialmente a fertilidade masculina (CREASY, 2001; FOLEY, 2001). No presente estudo não foram encontradas alterações no comportamento sexual e no teste da fertilidade realizado em machos experimentais adultos. Além disso, os níveis de testosterona e estradiol circulantes mantiveram-se inalterados na presença de alterações importantes nos sistemas de neurotransmissão central e nos testículos. Talvez sejam necessárias alterações ainda mais importantes para que um déficit no comportamento sexual masculino seja observado.

A progesterona, hormônio responsável pela manutenção da gestação, é produzido no interior do corpo lúteo. No estudo da fertilidade o peso dos ovários e o número de corpos lúteos não foram alterados pelo tratamento com os frutos, indicando produção normal de progesterona, que foi confirmada com a análise das concentrações de progestinas fecais, as quais se mostraram inalteradas nas fêmeas (mães e prole) experimentais. Esse mesmo quadro foi observado em ratas tratadas com o “póvilho da lobeira” (100 mg/kg/dia) durante a gestação (DG17 ao DG20) (CHANG et al., 2002). Sabe-se que a taxa de implantação, que correlaciona o número de corpos lúteos com o número de implantações nos cornos uterinos, é um indicador da capacidade reprodutiva. Os dados obtidos neste estudo corroboram com os achados do estudo de CHANG et al. (2002), e ambos indicam que o número de blastocistos implantados foi semelhante entre os

grupos tratado e controle. A presença de reabsorções indica falha no progresso do desenvolvimento embrionário. A taxa de reabsorções avaliada no presente trabalho mostrou-se semelhante entre os grupos tratado e controle, indicando progresso embrionário adequado no grupo experimental, novamente corroborando com o estudo anterior (CHANG et al., 2002).

O mecanismo proposto para desreguladores endócrinos, como a pregnenolona-16 α -carbonitrila (PCN), de atuarem promovendo alterações fisiopatológicas na tireóide como, por exemplo tumores, está ligado à capacidade que apresentam de aumentarem a glicuronidação hepática, uma vez que induzem a produção das enzimas UDP-glicuroniltransferases, e também a excreção biliar de tiroxina (T4), diminuindo os níveis circulantes deste hormônio (WILSON et al., 1996). Essas ações inibem a retroalimentação negativa ao hipotálamo e glândula pituitária, produzindo, na tireóide, estímulo prolongado do hormônio tireóide-estimulante (TSH). A extensão da conversão de T4 à T3 (triiodotironina), esta última 3 a 5 vezes mais ativa que a T4, e sua degradação nos tecidos, também irá afetar a concentração plasmática e influenciar o efeito de retroalimentação negativa sobre a liberação de TSH (RANG et al., 1995). O hormônio T4 é o principal produto de secreção da tireóide, e cerca de 80% é convertido a T3, que é considerado o hormônio ativo (VISSER, 1990). Na glândula pituitária, cerca de 50% do hormônio T3, que se liga a receptores para modular a liberação de TSH, são provenientes do hormônio T4 secretado pela tireóide (LEONARD e KOEHRLE, 1996). No atual estudo, os níveis de T4 e T3 mostraram-se reduzidos nos machos experimentais. A capacidade dos desreguladores endócrinos aumentarem a glicuronidação hepática e a eliminação biliar de tiroxina (T4),

diminuindo os níveis circulantes deste hormônio (WILSON et al., 1996) aqui pode ser considerada. É sabido ainda que os efeitos de substâncias esteroidais diretamente na tireóide ou indiretamente atuando como indutores de enzimas hepáticas acometem mais intensamente ratos machos do que fêmeas, podendo este fato explicar a ausência de alterações nas concentrações dos hormônios T3 e T4 na prole experimental feminina (CAPEN, 1996). Sabendo-se que a redução dos níveis séricos de T4 são provenientes de um aumento na excreção de hormônios tireoideanos ou desbalanços na conversão periférica de T4 a T3, promovendo alterações na retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-pituitária-tireóide (VANSELL e KLAASSEN, 2001), talvez os glicoalcalóides, agindo como indutores de glicoroniltransferases no fígado de fetos machos, tenham modificado o metabolismo e secreção destes hormônios pela tireóide.

Estes dados tomados em conjunto, mostram que tanto a prole masculina como a prole feminina foram susceptíveis aos efeitos dos glicoalcalóides esteroidais presentes nos frutos da *S. lycocarpum*. Porém as consequências da exposição aos princípios ativos dos frutos foi diferente entre a prole masculina e feminina. Levando-se em consideração que os machos experimentais apresentaram importante degeneração nos ductos testiculares acompanhado de ausência de alterações no comportamento sexual, e que fêmeas experimentais apresentaram redução do comportamento sexual, talvez os frutos da *S. lycocarpum*, mais especificamente o alcalóide esteroide solasodina, exerça atividade estrogênica e, possivelmente, seja capaz de atravessar a barreira placentária e hemato-encefálica do feto, exercendo seu possível efeito estrogênico diretamente no feto.

Conclusões

8. Conclusões

- Os frutos verdes dessecados e moídos da *S. lycocarpum*, colhidos em Itajubá-MG, apresentam 1,78% de alcalóides totais, sendo que aproximadamente 0,6% corresponde ao glicoalcalóide solamargina e 0,9% ao glicoalcalóide solasonina.
- O tratamento promoveu leve toxicidade materna, evidenciada por redução do peso corporal e do ganho de peso das mães durante o período de exposição aos frutos.
- O tratamento não prejudicou a gestação, mas mostrou leve fetotoxicidade, pois 20% das ninhadas experimentais (5 ninhadas) apresentaram um ou dois natimortos e os filhotes experimentais apresentaram, ao nascimento, menor peso e reduzido comprimento corporal.
- O estudo da fertilidade, avaliado nas proles adultas, não detectou anormalidades quanto a capacidade reprodutiva das proles feminina e masculina experimentais.
- Provavelmente a solasodina, via atividade estrogênica, foi responsável pelas alterações histopatológicas (degeneração dos ductos testiculares em machos adultos), comportamentais (redução do coeficiente de lordose em fêmeas adultas) e neuroendócrinas encontradas na prole.

Referências

9. Referências

- AGMO, A. Male rat sexual behavior. **Brain Res. Protoc.**, Amsterdam, v.1, p.203-209, 1997.
- AGMO, A. e FERNÁNDEZ, H. Dopamine and sexual behavior in the male rat: a reevaluation. **J. Neural Transm.**, v.77, p. 21-37, 1989.
- AHLENIUS, S. e LARSSON, K. Apomorphine and haloperidol-induced effects on male rat sexual behavior: no evidence for actions due of central dopamine autoreceptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, New York, v.21, p.246-466, 1984.
- ARGÔLO, A.C.C.; CHARLWOOD, B.V.; PLETSCHE, M. The regulation of solasodine production by *Agrobacterium rhizogenes*: transformed roots of *Solanum aviculare*. **Planta Med.**, Stuttgart, v.66, p.448-451, 2000.
- ATTA-UR-RAHMAN e CHOUDHARY, M.I. Chemistry and biology of steroidal alkaloids. In: CORDELL, G.A., ed. **The alkaloids: Chemistry and Biology**. San Diego: Academic Press, p.61-106, 1998. (The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology, v.50).
- AUBERT, S.; DAUNAY, M.C.; POCHARD, E. Saponosides steroidiques de l'aubergine (*Solanum melongena* L.). **Agronomie**, Les Ulis, v.9, p.641-651, 1989.
- BAJAK, K.L.; KAUR, G.; CHADHA, M.L. Glycoalkaloid content and other chemical constituents of the fruits of some egg plants (*Solanum melongena* L.) varieties. **J. Plant Foods**, London, v.3, p.163-168, 1979.

- BAKER, D.C.; KEELER, R.F.; GAFFIELD, W. Pathology in hamsters administered *Solanum* plant species that contain steroidal alkaloids. **Toxicon**, Amsterdam, v.27, n.12, 1331-1337, 1989.
- BARUA, A.; SARMA, P.C.; BARUA, R.N.; SINGH, R.S. Role of photohormones on berry yield and solasodine content of *Solanum khasianum*. **Fitoterapia**, Amsterdam, v.68, n.6, p.495-497, 1997.
- BEACH, F. A. Cerebral and hormonal control of reflexive mechanisms involved in copulatory behavior. **Physiol. Rev.** , v.47, p.289-316, 1967.
- BEACH, F. A. Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in female mammals. **Horm. Behav.**, v.7, p.105-138, 1976.
- BITRAN, D.; HULL, E. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, Amsterdam, v.11, p.365-389, 1987.
- BLANKEMEYER, J.T.; MCWILLIAMS, M.L.; RAYBURN, J.R.; WEISSENBERG, M.; FRIEDMAN, M. Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.36, p.383-389, 1998.
- BROWN, J.L.; WASSER, S.K.; WILDT, D.E.; GRAHAM, L.H. Comparative aspects of steroid hormones metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. **Biol. Reprod.**, Madison, v.51, p.776-786, 1994.
- BROWN, J.L.; WILDT, D.E. Assessing reproductive status in wild felids by noninvasive faecal monitoring. **Int. Zoo Yearb.**, London, v.35, p.173-191, 1997.
- BROWN, J.L.; WILDT, D.E.; WELEBNOWSKI, N.; GOODROWE, K.L.; GRAHAM, L.H.; WELLS, S.; HOWARD, J.G. Reproductive activity in captive female

cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.106, p.337-346, 1996.

CAPEN, C. C. Toxic responses of the endocrine system. In: CASARETT e DOULL Toxicology: The Basic Science of Poisons. 5^a ed. New York: Ed. McGraw-Hill, 1996.

CHAM, B.E. Monograph on BEC. **Drugs Future**, Barcelona, v.13, p.714-716, 1988.

CHAM, B.E.; DAUNTER, B. Curaderm (antineoplastic) launched in Australia. **Drug News Perspect.**, Barcelona, v.2, p.112, 1989.

CHAM, B.E.; DAUNTER, B. Solasodine glycosides: selective cytotoxicity for cancer cells and inhibition of cytotoxicity by rhamnose in mice with sarcoma 180. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v.55, p.221-225, 1990a.

CHAM, B.E.; DAUNTER, B. Topical treatment of pre-malignant and malignant skin cancers with curaderm. **Drugs Today**, Barcelona, v.26, p.55-58, 1990b.

CHAM, B.E.; DAUNTER, B.; EVANS, R.A. Topical treatment of malignant and premalignant skin lesions by very low concentrations of a standard mixture (BEC) of solasodine glycosides. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v.59, p.183-192, 1991.

CHAM, B.E.; GILLIVER, M.; WILSON, L. Anti-tumor effects of glycoalkaloids isolated from *Solanum sodomaeum*. **Planta Med.**, Stuttgart, v.53, p.34-36, 1987.

- CHAM, B.E.; MEARES, H.M. Glycocalcals from *Solanum sodomaeum* are effective in the treatment of skin cancers. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v.36, p.111-119, 1987.
- CHAMI, L.A.; MÉNDEZ, R.; CHATAING, B.; O'CALLAGHAN, J.; USUBILLAGA, A.; LACRUZ, L. Toxicological effects of α -solanargine in experimental animals. **Phytother. Res.**, Bognor Regis, v.17, p.254-258, 2003.
- CHANG, L.C.; TSAI, T.R.; WANG, J.J.; LIN, C.N.; KUO, K.W. The rhamnose moiety of solanargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, Orlando, v.242, p.21-25, 1998.
- CHANG, C.V.; FELÍCIO, A.C.; REIS, J.E.P.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M. Fetal toxicity of *Solanum lycocarpum* (*Solanaceae*) in rats. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v.81, p.265-269, 2002.
- CHEN, T.; LI, W.S.; CHANG, C.M. Clinical and experimental study of yangxueshengru oral liquor in promoting puerperal breast milk secretion. **Chung Kuo His I Chieh Ho Tsa Chih**, v.15, p.528-531, 1995.
- CHRISTENSEN, L.W.; GORSKI, R.A. Independent masculinization of neuroendocrine systems by intracerebral implants of testosterone or estradiol in the neonatal female rat. **Brain Res.**, Amsterdam, v.146, p.325-340, 1978.
- CIPOLLINI, M.L.; LEVEY, D.J. Why are some fruits toxic? Glycoalkaloids in *Solanum* and fruit choice by vertebrates. **Ecology**, Tempe, v.78, n.3, p.782-798, 1997.
- CLARINGBOLD, W.D.B.; FEW, J.D.; BRACE, C.J.; RENWICK, J.H. The disposition and metabolism of [3 H]-solasodine in man and syrian hamster. **J. Steroid Biochem.**, Oxford, v.13, p.889-895, 1980.

- CORBIER, P.; EDWARDS, D.A.; ROFFI, J. The neonatal testosterone surge: a comparative study. **Arch. Int. Physiol., Biochim. Biophys.**, Liege, v.100, p.127-131, 1992.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.61, 1984
- CREASY, D.M. Pathogenesis of male reproductive toxicity. **Toxicol. Pathol.**, Philadelphia, v.29, p.64-76, 2001.
- CRUZ, G.L. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. 3.ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, p.360, 1985.
- DALL'AGNOL, R.; VON POSER, G.L. The use of polyssaccharides in the management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v.71, p.337-341, 2000.
- DARBRE, P.; YATES, J.; CURTIS, S.; KING, R.J.B. Effect of estradiol on human breast cancer cells in culture. **Cancer Res.**, Birmingham, v.43, p.349-354, 1983.
- DAUNTER, B.; CHAM, B.E. Solasodine glycosides: *in vitro* preferencial cytotoxicity for human cancer cells. **Cancer Lett.**, Amsterdam, v.55, p.209-220, 1990.
- DAHLGREN, I.L.; MATUCSZCZYK, J.V.; HARD, E. Sexual orientation in male pregnant rats prenatally exposed to ethanol. **Neurotoxicol. Teratol.**, Amsterdam, v.13, p. 267-269, 1991.

- DE VRIES, G.J. Sex differences in neurotransmitter systems. **J. Neuroendocrinol.**, Oxford, v.2, n.1, p.1-13, 1990.
- DIXIT, V.P.; GUPTA, R.S. Antiespermatogenic antiandrogenic properties of solasodine ($C_{27}H_{43}O_2N$) obtained from *Solanum xanthocarpum* berries on the male genital tract of dog (*Canis familiars*). **Int. J. Androl.**, Oxford, v.5, p.295-307, 1982.
- DIXIT, V.P.; GUPTA, R.S.; GUPTA, S. Antifertility plant products: testicular cell population dynamics following solasodine ($C_{27}H_{43}O_2N$) administration in rhesus monkey (*Macaca mulatta*). **Andrologia**, Berlin, v.21, n.6, p.542-546, 1989.
- DORNER, G.; HINZ, G.; DOCKE, F.; Tonjes, R. Effects od psychotropic drugs on brain differentiation in female rats. **Endocrinology**, v. 70, p. 113-123, 1977.
- ELTAYEB, E.A.; AL-ANSARI, A.S.; RODDICK, J.G. Changes in the steroidal alkaloid solasodine during development of *Solanum nigrum* and *Solanum incanum*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.46, n.3, p.489-494, 1997.
- ERSKINE, M.S.; TOBET, S.A.; BAUM, M.J. Effect of birth on plasma testosterone, brain aromatase activity and hypothalamic estradiol in male and female ferrets. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.122, p.524-530, 1988.
- FELICIO, L.F.; PALERMO-NETO, J.; NASELLO, A.G. Perinatal Bromopride Treatment: Effects On Sexual Behavior Of Male And Female Rats. **Behav. Neural Biol.**, Estados Unidos, v. 52, n. 1, p. 145-151, 1989.
- FEWELL, A.M.; RODDICK, J.G.; WEISSENBERG, M. Interactions between the glycoalkaloids solasonine and solamargine in relation to inhibition of fungal growth. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.37, n.4, p.1007-1011, 1994.

- FOLEY, G.L. Overview of male reproductive pathology. **Toxicol. Pathol.**, Philadelphia, v.29, p.49-63, 2001.
- FONIN, V.S.; SHAIN, S.S.; VANDYSHEV, V.V. Enzymatic hydrolysis of steroid glycosides in plant raw material for medicine use. **Appl. Biochem. Microbiol.**, Dordrecht, v.32, n.5, p.465-468, 1996.
- FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MACKEY, B.E. Feeding of potato, tomato and eggplant alkaloids affects food consumption and body and liver weights in mice. **J. Nutr.**, Bethesda, v.126, n.4, p.989-999, 1996.
- FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MACKEY, B.E. Effect of feeding solanidine, solasodine and tomatidine to non-pregnant and pregnant mice. **Food Chem. Toxicol.**, Amsterdam, v.41, p.61-71, 2003.
- FUKUHARA, K.; KUBO, I. Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incanum* by two countercurrent chromatographic methods. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.30, n.2, p.685-687, 1991.
- GAFFIELD, W.; KEELER, R.F. Craniofacial malformations induced in hamsters by steroidal alkaloids. **J. Nat. Toxins**, Fort Collins, v.5, n.1, p.25-38, 1996.
- GALLAVAN, R.H.; HOLSON, J.F.; STUMP, D.G.; KNAPP, J.F.; REYNOLDS, V.L. Interpreting the toxicologic significance of alteration in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. **Reprod. Toxicol.**, Amsterdam, v.13, p.383-390, 1999.
- GOSWANI, A.; KOTOKY, R.; RASTOGI, R.C.; GHOSH, A.C. A one-pot efficient process for 16-dehydropregnenolone acetate. **Org. Process Res. Dev.**, Columbus, v.7, p.306-308, 2003.

GUERRA, M.O.; REIS, J.E.P.; OLIVEIRA, L.E.G.; PETERS, V.M. Avaliação do potencial teratogênico do fruto da lobeira (*Solanum grandiflorum*), administrado do período de organogênese do rato. **Bol. Centr. Biol. Reprod.**, Juiz de Fora, v.16, p.52-56, 1997.

HALMOS, M.; PUSZTAY, É.; ATTILA, J. Degradation of solasodine to 6-chloropregnadienolone acetate. **Steroids**, Amsterdam, v.7, n.3, p.195-204, 1966.

HARAGUCHI, M.; UCHIMURA, R.T.; MOTIDOME, M.; GOTTLIEB, O. Aproveitamento dos esteróides dos frutos da lobeira. **Cienc. Cult.**, São Paulo, v.32, p.81-82, 1978.

HART, B.L.; LEEDY, M.S. Neurological bases of male sexual behavior: a comparative analysis. In: ADLER, N.; PFAFF, D.W.; GOY, R.W. **Reproduction**: handbook of behavioral neurobiology. 7.ed. Nova York: Plenum Press, p.373-422, 1985.

HESS, R.A.; BUNICK, D.; LEE, K.H.; BAHR, J.; TAYLOR, J.A.; KORACH, K.S.; LUBAHN, D.B. A role for estrogens in the male reproductive system. **Nature**, London, v.390, n.6659, p.509-512, 1997.

HETTA, J.; MEYERSON, B.J. Sexual motivation in the male rats: A methodological study of sex-specific orientation and the effects of gonadal hormones. **Acta Physiologic Scandinavic. Suppl.** v.453, p.1-68, 1978.

HULL, E.M.; NISHITA, J.K.; BITRAN, D.; DALTERIO, S. Perinatal dopamine-related drugs demasculinize rats. **Science**, v.224, p. 1011-1013, 1984.

- HULL, E.M.; DU, J.; LORRAIN, D.S.; MATUSZEWICH, L. Testosterone, preoptic dopamine, and copulation in male rats. **Brain Res. Bull.**, v.44, p.327-333, 1997.
- HULL, E.M.; LORRAIN, D.S.; DU, J.; MATUSZEWICH, L.; LUMLEY, L.A., PUTNAM, S.K.; MOSES, J. Hormone-neurotransmitter interactions in the control of sexual behavior. **Behav. Brain Res.**, Amsterdam, v.105, p.105-116, 1999.
- INDRAYANTO, G.; SYAHRANI, A.; SONDAKH, R.; SANTOSA, M.H. Solasodine. **Anal. Profiles Drug Subst. Excipients**, San Diego, v.24, p.487-522, 1996.
- INSEL, T.R. The development of brain and behavior. In: BLOOM, F.E.; KUPFER, D.J. **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. New York: Raven Press, p.683-694, 1995.
- JACOBSON, C.; DAVIS, F.; GORSKI, R. Formation of sexually dimorphic nucleus of the pre-optic area: neuronal growth, migration and changes in cells number. **Dev. Brain Res.**, Amsterdam, v.19, p.65-71, 1985.
- JADHAV, S.J.; SHARMA, R.P.; SALUNKHE, D.K. Naturally occurring toxic alkaloids in foods. **Crit. Rev. Toxicol.**, Philadelphia, v.9, n.1, p.21-104, April, 1981. [Review].
- KANWAR, U.; BATLA, A.; SANYAL, S.N.; RANGA, A. Glycolytic enzyme activities of human and bovine spermatozoa treated in vitro with solasodine. **J. Ethnopharmacol.**, Amsterdam, v.28, p.249-254, 1990.
- KEELER, R.F.; BAKER, D.C.; GAFFIELD, W. Spirosolane-containing Solanum species and induction of congenital craniofacial malformations. **Toxicol.**, Amsterdam, v.28, n.8, p.873-884, 1990.

- KEELER, R.F.; BROWN, D.; DOUGLAS, D.R.; STALLKNECHT, G.B.; YOUNG, S. Teratogenicity of the Solanum alkaloid solasodine and of "Kennebec" potato sprouts in hamsters. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, Secaucus, v.15, n.5, p.522-524, 1976.
- KERBER, V.A.; MIGUEL, O.G.; MOREIRA, E.A.; GOMES, E.C.; WEISS, F.A.; VIEIRA, R.F. Avaliação qualitativa de alcalóides em três espécies de *Solanum* – Solanaceae (*S. grandiflorum*, *S. lacerdae*, *S. lycocarpum*), ênfase à Solasodina. **Rev. Bras. Farm.**, Rio de Janeiro, v.74, n.3, p.67-69, 1993.
- KEUKENS, E.A.J.; DE VRIJE, T.; JANSSEN, L.A.M.; DE BOER, H.; JANSSEN, M.; DE KROON, A.I.P.M.; JONGEN, W.M.F.; DE KRUIJFF, B. Glycoalkaloids selectivity permeabilize cholesterol containing biomembranes. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1279, p.243-250, 1996.
- KISSMANN, K.G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Bernardo do Campo: Basf, 1995.
- KUO, K.W.; HSU, S.H.; LI, Y.P.; LIN, W.L.; LIU, L.F.; CHANG, L.C.; LIN, C.C.; LIN, C.N.; SHEU, H.M. Anticancer activity evaluation of the *Solanum* glycoalkaloid solamargine. **Biochem. Pharmacol.**, Amsterdam, v.60, p.1865-1873, 2000.
- KUSANO, G.; TAKAHASHI, A.; NOZOE, S.; SONODA, Y.; SATO, Y. Solanum alkaloids as inhibitors of enzymatic conversion of dihydrolanosterol into cholesterol. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.35, n.10, p.4321-4323, 1987.
- LEONARD, B.E. Behavioral teratology: post-natal consequences of drug exposure in utero. **Arch. Toxicol.**, Heidelberg, v.5, suppl., p.45-58, 1982.
- LEONARD, J.L.; KOEHRLE, J. Intracellular pathways of iodothyronine metabolism. In: WERNER, S.C.; INGBAR, S.H.; BRAVERMAN, L.E. **Werner and Ingbar's**

- the thyroid**: a fundamental and clinical text. 7.ed. Philadelphia: Lippincott Raven, p.125-161, 1996.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: aquáticas, tóxicas, e medicinais. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, p.392, 1991.
- LUKE, M.C.; COFFEY, D.S. The male sex accessory tissues: structure, androgen action and physiology. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D., eds. **The physiology of reproduction**. 2.ed. Nova York: Raven Press, p.989-1034, 1994.
- MAGA, J.A. Potato glycoalkaloids. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Philadelphia, v.12, n.4, p.371-405, 1980. [Review].
- MAHATO, S.B.; SAHU, N.P.; GANGULY, A.N.; KASAI, R.; TANAKA, O. Steroidal alkaloids from *Solanum khasianum*: application of ^{13}C NMR spectroscopy to their structural elucidation. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.19, p.2017-2020, 1980.
- MALMNAS, C.O. Monoaminergic influence on testosterone activated copulatory behavior in castrated male rat. **Acta Physiol. Scand.**, Oxford, v.395, p.1-12, 1973.
- MANSON, J.M.; KANG, Y.J. Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In: HAYES, A.W., ed. **Principles and methods of toxicology**. 3.ed. Nova York: Raven Press, p.989-1034, 1994.
- MARUO, V.M.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Toxicological evaluations of long term consumption of *Solanum lycocarpum* St. Hill fruits in male and female adult rats. **Phytomedicine**, Jena, v.10, p.48-52, 2003a.

- MARUO, V.M.; SOARES, M.R.; BERNARDI, M.M.; SPINOSA, H.S. Embryotoxic effects of *Solanum lycocarpum* St. Hill fruits consumption during preimplantation and organogenesis in rats. **Neurotoxicol. Teratol.**, Amsterdam, v.25, p.627-631, 2003b.
- MCCLUSKY, N.J.; NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science**, Washington, v.211, p.1294-1303, 1981.
- MCEWEN, B.S., LIEBERBURG, I., CHAPTAL, C., KREY, L.C. Aromatization: importance of sexual differentiation of the neonatal rat brain. **Horm. Behav.**, New York, v.9, p.249-263, 1978.
- MENDELSON, S. D. A review and reevaluation of the role for serotonin in the modulation of lordosis behavior in the female rat. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v.16, p.309-350, 1992.
- MEYERSON, B. J. The effect of neuropharmacological agents on hormone-activated estrus behavior in ovariectomized rats. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v.150, p.4-33, 1964.
- MOLA, J.L.; ARAUJO, E.R.; MAGALHÃES, G.C. Solasodina em espécies de *Solanum* do cerrado do Distrito Federal. **Quim. Nova**, São Paulo, v.20, n.5, p.460-462, 1997.
- MOTIDOME, M.; LEEKNING, M.E.; GOTTLIEB, O.R. A química das solanáceas brasileiras. I. A presença de solamargina e de solasonina no juá e na lobeira. **Ann. Acad. Bras. Cienc.**, Rio de Janeiro, v.42, p.375-376, 1970.
- MOTTA, S.; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M.; REIS, J.E.P. Administração de polvilho de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil) a ratas lactando: desenvolvimento físico das crias. **Lecta**, Lençóis Paulista, v.1, p.53-60, 2002a.

- MOTTA, S.; PETERS, V.M.; REIS, J.E.P.; GUERRA, M.O. Lobeira powder administration during rat lactation: maternal behavior and neuromotor development of pups. **Rev. Bras. Zootecias**, Juiz de Fora, v.4, n.2, p.255-268, 2002b.
- NADLER, R.D. Masculinization of female rats by intracranial implantation of androgen in infancy. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, Washington, v.66, p.157-167, 1968.
- OLIVEIRA, A.C.P.; ENDRINGER, D.C.; ARAÚJO, R.J.P.; BRANDÃO, M.C.L.; COELHO, M.M. The starch from *Solanum lycocarpum* St. Hil. fruit is not a hypoglycemic agent. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.36, p.525-530, 2003a.
- OLIVEIRA, E.N.; SANTOS, C.D.; ABREU, C.M.P.; CORRÊA, A.D.; SANTOS, J.Z.L. Análise nutricional de fruta-do-lobo (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) durante o amadurecimento. **Cienc. Agrotecnol.**, Lavras, v.27, n.4, p.846-851, 2003b.
- OSOSKI, A.L.; KENNELLY, E.J. Phytoestrogens: a review of the present state of research. **Phytother. Res.**, Bognor Regis, v.17, p.845-869, 2003.
- PANTER, K.E.; KEELER, R.F.; JAMES, L.F.; BUNCH, T.D. Impact of plant toxins on fetal and neonatal development: a review. **J. Range Manage.**, Denver, v.45, n.1, p.52-57, 1992.
- PAZKOWSKI, C.; KALINOWSKA, M.; WOJCIECHOWSKI, Z.A. Phospholipids modulate the substrate specificity of soluble UDP-glucose: steroid glycosyltransferase from eggplant leaves. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.58, p.663-669, 2001.

- PETERS, V.M.; PINHEIRO, N.L.; REIS, J.E.P.; GUERRA, M.O. Absence of interceptive effect in rats treated with *Solanum lycocarpum* (St. Hil). **Contraception**, Orlando, v.63, p.53-55, 2001.
- PETERS, V.M.; PINHEIRO, N.L.; REIS, J.E.P.; GUERRA, M.O. Early development of the rat embryo in mothers treated with *Solanum lycocarpum* St. Hil. **Rev. Bras. Plant. Med.**, Botucatu, v.4, n.2, p.13-17, 2002.
- PRELOG, V., JEGER, O. In: MANSKE, R.H.F.; HOLMES, H.L., eds. **The alkaloids**: chemistry and physiology. New York: Academic Press, v.7, p.343, 1960.
- PUTALUN, W.; TAURA, F.; QING, W.; MATSUSHITA, H.; TANAKA, H.; SHOYAMA, Y. Anti-solasodine glycoside single-chain Fv antibody stimulates biosynthesis of solasodine glycoside in plants. **Plant Cell Rep.**, Heidelberg, v.22, p.344-349, 2003.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Sistema Endócrino. In: _____ **Farmacologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.21, p.332-361, 1997.
- REDDEL, R.R.; MURPHY, L.C.; SUTHERLAND, R.L. Factors affecting the sensitivity of T-47 human breast cancer cell to tamoxifen. **Cancer Res.**, Birmingham, v.44, p.2398-2405, 1984.
- RIPPERGER, H. *Solanum* steroid alkaloids: an update. In: PELLETIER, S.W., ed. **Alkaloids**: chemical and biological perspectives. Amsterdam: Elsevier, v.12, p.103-185, 1998.
- RIPPERGER, H.; SCHREIBER, K. *Solanum* steroid alkaloids. In: MANSKE, R.H.F.; RODRIGO, R.G.A., eds. **The alkaloids**: chemistry and physiology. Nova York: Academic Press, v.19, p.81-192, 1981.

- RIZK, A.M.; ABOU-ZIED, E.N. The steroidal constituents of *Solanum cyananthum*. **J. Chem. U. A. R.**, Giza, v.23, p.347-349, 1970.
- RODDICK, J.G. Steroidal glycoalkaloids: nature and consequences of bioactivity. In: WALLER, G.R.; YAMASAKI, K., eds. **Saponins used in traditional and modern medicine**. Nova York: Plenum Press, p.277-292, 1996. (American Chemical Society Symposium on Saponins: Chemistry and Biological Activity, 1995, Chicago).
- RODDICK, J.G.; RIJNENBERG, A.L.; WEISSENBERG, M. Alterations to the permeability of liposome membranes by the solasodine based-glycoalkaloids solasonine and solamargine. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.31, p.1951-1954, 1992.
- RODDICK, J.G.; WEISSENBERG, M.; LEONARD, A.L. Membrane disruption and enzyme inhibition by naturally-occurring and modified chacotriose-containing *Solanum* steroidal glycoalkaloids. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.56, p.603-610, 2001.
- RUBIN, B.S.; BARFIELD, R.J. Priming of estrus responsiveness by implants of 17-estradiol in the ventromedial hypothalamic nucleus in the rat. **Endocrinology**, Chevy Chase, v.106, p.504-513, 1980.
- SÁ, R.C.S.; VIREQUE, A.A.; REIS, J.E.P.; GUERRA, M.O. Avaliação do potencial tóxico de extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* (St. Hil) após administração em camundongos suíços. **Bol. Centr. Biol. Reprod.**, Juiz de Fora, v.17, p.31-40, 1998a.
- SÁ, R.C.S.; VIREQUE, A.A.; REIS, J.E.P.; GUERRA, M.O. Avaliação da toxicidade reprodutiva de extrato aquoso de *Solanum lycocarpum* (St. Hil) administrado a ratos Wistar. **Bol. Centr. Biol. Reprod.**, Juiz de Fora, v.17, p.41-50, 1998b.

- SÁ, R.C.S.; VIREQUE, A.A.; REIS, J.E.P.; GUERRA, M.O. Evaluation of the toxicity of *Solanum lycocarpum* in the reproductive system of male mice and rats. **J. Ethnopharmacol.**, Orlando, v.73, p.283-287, 2000.
- SALEH, M. The steroidal constituents of *Solanum arundo*. **J. Chem. U. A. R.**, Giza, v.23, p.377-378, 1970.
- SALEWSKI, E. Farbemethode zum makroskopischen nachweis von implantatcosstellen am uterus der ratten nach naunyn schmederbeys. **Arch. Pharmacol.**, v.247, p.367, 1964.
- SATO, Y.; NAGAI, M. Degradation of solasodine. **J. Org. Chem.**, Columbus, v.37, n.16, p.2629-2631, 1972.
- SAWAGADO, L.; HOUEBINE, L.M. Identification of lactogenic compound present in beer. **Ann. Biol. Clin.**, Montrouge, v.46, n.2, p.129-134, 1988.
- SILVA, S.Z.C.; VASCONCELOS, A.C. A lactação. In: Bedran, J.N. **O uso de drogas na gravidez e na lactação**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.14-23, 1988.
- SINGH, S.; KHANNA, N.M.; DHAR, M.M. Solaplumbing, a new anticancer glycoside from *Nicotiana plumbaginifolia*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.13, p.2020-2022, 1979.
- SOARES, M.R. **Efeitos na esfera reprodutiva da exposição prolongada a *Solanum lycocarpum* durante a puberdade de ratos**. Dissertação de mestrado. FMVZ-USP, 2005.
- SPILLER, R.C. Pharmacology of dietary fiber. **Pharmacol. Ther.**, Amsterdam, v.62, p.407-427, 1994.

THE MERCK Index, 12.ed. Whitehouse Station: Merck, p.8854, 1996.

UPHOUSE, L. Female gonadal hormones, serotonin, and sexual receptivity. **Brain Res. Rev.**, v.33, p.242-257, 2000.

VANSELL, N.R.; KLAASSEN, C.D. Increased biliary excretion of thyroxine by microsomal enzyme inducers. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v.176, p.187-194, 2001.

VIEIRA, G.; FERREIRA, P.M.; MATOS, L.G.; FERREIRA, E.C.; RODOVALHO, W.; FERRI, P.H.; FERREIRA, H.D.; COSTA, E.A. Anti-inflammatory effect of *Solanum lycocarpum* fruits. **Phytother. Res.**, Bognor Regis, v.17, p.892-896, 2003.

VISSER, T.J. Importance of deiodination and conjugation in the hepatic metabolism of thyroid hormone. In: GREER, M.A. **The thyroid gland**. New York: Raven Press, p.255-283, 1990. (Comprehensive endocrinology).

WANYONYI, A.W.; CHHABRA, S.C.; MKOJI, G.; EILERT, U.; NJUE, W.M. Bioactive steroidal alkaloid glycosides from *Solanum aculeastrum*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.59, p.79-84, 2002.

WEISSENBERG, M.; LEVY, A.; SVOBODA, J.A.; ISHAAYA, I. The effect of some *Solanum* steroidal alkaloids and glycoalkaloids on larvae of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.47, n.2, p.203-209, 1998.

WEISSENBERG, M. Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom. **Phytochemistry**, Amsterdam, v.58, p.501-508, 2001.