



NELMA NEYLANNE PINHO MUNIZ OLIVEIRA

**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E
REPRODUTIVAS DE RATOS WISTAR
MACHOS SUPLEMENTADOS COM EXTRATOS
DO FRUTO DE *Tribulus terrestris* L.**

**LAVRAS-MG
2015**

NELMA NEYLANNE PINHO MUNIZ OLIVEIRA

**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E REPRODUTIVAS DE RATOS
WISTAR MACHOS SUPLEMENTADOS COM EXTRATOS DO FRUTO
DE *Tribulus terrestris* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para obtenção do título de Mestre.

Dr. Raimundo Vicente de Sousa
Orientador

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Coorientadora

**LAVRAS-MG
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, Nelma Neylanne Pinho Muniz.

Características bioquímicas e reprodutivas de ratos Wistar machos suplementados com extratos do fruto de *Tribulus terrestris* L. / Nelma Neylanne Pinho Muniz Oliveira. – Lavras : UFLA, 2015.

102 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Raimundo Vicente de Sousa.

Bibliografia.

1. Extratos vegetais. 2. Anabolismo. 3. Proteína bruta. 4. Espermatogênese. 5. Células de Leydig. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

NELMA NEYLANNE PINHO MUNIZ OLIVEIRA

**CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E REPRODUTIVAS DE RATOS
WISTAR MACHOS SUPLEMENTADOS COM EXTRATOS DO FRUTO
DE *Tribulus terrestris* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração em Bioatividade de Plantas Medicinais, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2015.

Dra. Luciana de Paula Naves	UFOP
Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo	UFLA
Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci	UFLA

Dr. Raimundo Vicente de Sousa
Orientador

**LAVRAS-MG
2015**

*A todos que contribuíram para a concretização deste
trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus que me forneceu a fé indispensável para superar os obstáculos.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares pela oportunidade de realizar o mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Raimundo Vicente de Sousa pela orientação, paciência, acolhimento e exemplo.

À professora Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci por não ter medido esforços para a realização da pesquisa contribuindo imensamente desde a aquisição do material vegetal às análises fitoquímicas dos extratos vegetais.

Ao professor Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto pelo eterno incentivo e confiança.

À professora Dra. Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula pelo auxílio ao longo de todo o curso e esclarecimento de dúvidas.

Ao professor Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo por gentilmente disponibilizar o laboratório de reprodução de suínos para as análises espermáticas.

Ao professor Dr. José Rafael Miranda pelo auxílio nas análises histomorfométricas.

À professora Dra. Linaena Mércy Silva pela ajuda nas análises histopatológicas.

À Telma Azevedo, Diretora Comercial e Marketing da Indústria Farmacêutica Catedral pela disponibilidade e prontidão no fornecimento do material vegetal.

Aos amigos e colegas de laboratório Matheus Augusto Rodrigues Félix, Tauany Costa Silva Pereira, Luiz Gustavo Pessoa Rocha e Eric Francelino Andrade pelos incentivos ao longo do experimento e vibrações na obtenção dos resultados.

Aos amigos e colegas de curso Aline Aparecida Souza, Livia Gontijo Loura, Giselly Mota da Silva, Vauvenargues Lopes, Iberê Martí Moreira da Silva, Lucinda Helena Fragoso Monfort, Alzira da Conceição, Ellison Rosário de Oliveira, Nelma Ferreira de Paula Vicente, Diogo Silva Lordêllo, Messulan Rodrigues Meira, Iselino Nogueira Jardim, João Antônio Almeida Granja, Bety Shiue de Hsie, Elias Alves da Silva, Juliana Pace Salimena, Juliana de Brito Maia Miamoto, Camila Silva Bibiano e Luiz Fernando Annunziata Trevisan por toda a ajuda ao longo desses dois anos.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares Ana Luiza Rufini Pinto pela disponibilidade.

À equipe técnica do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Veterinária (Willian César Cortez e Joelson Moreira) pela atenção e ajuda.

À equipe técnica do Laboratório de Fitoquímica do Horto de Plantas Medicinais (Annete de Jesus Boari Lima e Luiz Gonzaga Gelioli) pelo auxílio na obtenção do extrato e frações vegetais.

À equipe técnica do Laboratório de Sementes (Antônio Massensini Júnior) pelo auxílio na liofilização da fração aquosa insolúvel em metanol.

À equipe técnica do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (Fidélis Antônio da Silva Júnior) pelo cuidado com os animais, indispensáveis para a concretização da pesquisa.

À equipe técnica do Laboratório de Citologia e Histologia Veterinária (Vanessa Souza Reis Melo) que se fez disponível e atenciosa.

À equipe técnica do Laboratório de Pesquisa Animal do Departamento de Zootecnia (Márcio dos Santos Nogueira) pela grande ajuda.

Aos meus pais Leda Maria Pinho Muniz Oliveira e José Franklim de Oliveira Filho pelo apoio incondicional.

À tia Nelma Pinho da Cunha Muniz por ser meu alicerce.

A minha prima e psicóloga Larissa de Carvalho Muniz pela torcida e incentivo.

Ao João Paulo Gomes Viana por todo amor, companheirismo e compreensão.

RESUMO GERAL

O *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) é popularmente conhecido por vários nomes como tribulus, abrolhos, viagra natural, videira da punctura, dentre outros. É originário da Índia, mas atualmente está amplamente distribuído em regiões quentes em todo o mundo. Na medicina tradicional chinesa e indiana, a planta é utilizada no tratamento da infertilidade, impotência, disfunção erétil e baixa libido. Os extratos dessa espécie contêm, principalmente, saponinas esteroidais, alcaloides e flavonoides. Objetivou-se, com o presente estudo, avaliar as características bioquímicas e reprodutivas de ratos Wistar machos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* L. Foram realizadas extrações por maceração dinâmica, a partir de frutos secos pulverizados de *Tribulus terrestris* para a obtenção do extrato etanólico. Esse extrato foi fracionado por partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. Vinte ratos machos foram distribuídos em 4 grupos (n=5). O grupo controle recebeu água destilada, enquanto os grupos restantes receberam diariamente extrato etanólico, frações hexânica ou aquosa solúvel em metanol na dose única de 42mg/kg/dia durante 70 dias. Ao final do experimento, após os animais serem anestesiados e eutanasiados, amostras de sangue e rins, fígado, baço, tecido adiposo epididimário e testículos foram coletados para análises posteriores. As carcaças foram limpas e pesadas para avaliação da composição centesimal corporal. Foram realizadas avaliações histopatológicas do fígado e rim e histomorfometria do testículo. Foi avaliada a qualidade espermática (motilidade, morfologia, concentração e viabilidade espermática). *Tribulus terrestris* aumentou o percentual de proteína da carcaça sem proporcionar ganho de peso corporal. Na análise dos parâmetros biométricos, os pesos testiculares médios dos grupos suplementados com extrato etanólico e fração aquosa solúvel em metanol apresentaram aumento significativo quando comparados ao grupo controle. O índice gonadossomático, a altura do epitélio do túbulo seminífero, o volume tubular e o comprimento total dos túbulos apresentaram-se aumentados no grupo suplementado com extrato etanólico. O volume nuclear, volume citoplasmático e volume individual das células de Leydig aumentaram nos animais suplementados com as frações hexânica e aquosa solúvel em metanol. Conclui-se que *Tribulus terrestris* L. aumenta o percentual de proteína bruta na carcaça de ratos Wistar machos. Além disso, o extrato etanólico influencia na espermatogênese evidenciado pelo aumento do comprimento tubular total, volume tubular e altura do epitélio tubular; enquanto as frações hexânica e aquosa solúvel em metanol promovem alterações no compartimento intertubular, pois aumentam o volume nuclear, volume citoplasmático e volume individual das células de Leydig.

Palavras-chave: Extratos vegetais. Anabolismo. Composição corporal. Proteína bruta. Espermatogênese. Células de Leydig.

ABSTRACT

The *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae), commonly known as tribulus, thorn, natural viagra, puncture vine, among other names, is originary of India, but it is widespread in warm regions around the world. In the Chinese and Indian traditional medicine, this plant is used to treat infertility, sexual impotence, erectile dysfunction and low libido. Extracts obtained from this plant specie contain steroidal saponins, alkaloids and flavonoids. In this study, we aimed to assess the biochemical and reproductive characteristics of male Wistar rats supplemented with extracts and fractions of fruits of *Tribulus terrestris* L. Ethanolic extract was obtained by means of dynamic maceration of sprayed dried fruit. This extract was fractionated by liquid-liquid partition, using increasing polarity solvents. Twenty male rats were separated in four groups, 5 rats each. The control was supplemented with distilled water, while the others were daily given the ethanolic extract, hexanic or aqueous fraction soluble in methanol in a single dose of $42 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ for 70 days. In the end of the experiment, animals were anaesthetized and euthanized. Then, samples of blood and kidneys, liver, spleen, epididymal adipose tissue and testicle, were collected for further analyses. Carcasses were clean and weighed to assess corporeal centesimal composition. Histopathological assessment of liver and kidney, and the testicular histomorphometry were carried out. Biometric parameters related to sperm quality, namely, motility, morphology, concentration and sperm viability, were assessed. *Tribulus terrestris* increased the percentage of protein in the carcass, without resulting in weight gain. The mean testicular weight of groups supplemented with ethanolic extract and aqueous fraction soluble in methanol showed significant increase when compared to the control. The gonadosomatic index, epithelial height of seminiferous tubule, tubular volume and the total length of tubules were increased in the group supplemented with ethanolic extract. The nuclear, cytoplasmic and individual volume of Leydig cells increased in animals supplemented with hexanic and aqueous fractions soluble in methanol. It is concluded that the *Tribulus terrestris* L. increases the content of crude protein in the carcass of male Wistar rats. In addition, the ethanolic extract influences the spermatogenesis, shown by the increase of total tubular length, tubular volume and height of tubular epithelium, while the hexanic and aqueous fractions soluble in methanol promote changes in the intertubular compartment, because they increase the nuclear, cytoplasmic and individual volume of Leydig cells.

Keywords: Vegetal extract. Anabolism. Corporeal composition. Crude protein. Spermatogenesis. Leydig cells.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 Fruto de *Tribulus terrestris* L. 18

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Figura 1 Fluxograma da obtenção do extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* L. a partir de partições líquido-líquido 49

Figura 2 Corte histológico do fígado de animais suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* durante 70 dias 60

Figura 3 Corte histológico do rim esquerdo de animais suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* durante 70 dias 61

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1 Ganho médio diário de peso (g), consumo médio diário de ração (g) e consumo médio diário de água (mL) de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* durante 70 dias (média ± desvio padrão) (n=20)..... 57

Tabela 2 Composição centesimal da carcaça de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* (média ± desvio padrão) (n=20)..... 57

Tabela 3 Análises bioquímicas sanguíneas de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* (média ± desvio padrão) (n=20) 58

Tabela 4 Peso relativo de órgãos de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* (média ± desvio padrão) (n=20) 59

ARTIGO 2

Tabela 1 Dados biométricos e morfométricos de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* (média ± desvio padrão) (n=20) 83

Tabela 2 Qualidade espermática de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* (média ± desvio padrão) (n=20) 84

LISTA DE ESTRUCTURAS QUÍMICAS

(1)	Protodioscina	24
(2)	Protogracillina.....	24
(3)	Desgalactotigonina	27
(4)	F-gitonina	27
(5)	Gitonina	27
(6)	Desglucolanatigonina	27
(7)	Tigogenina 3- <i>O</i> - β -D-xylopyranosyl(1-2)-[β -D-xylopyranosyl(1-3)]- β - D-glucopyranosyl(1-4)-[α -L-rhamnopyranosyl(1-2)]- β -D- galactopyranoside.....	27
(8)	(25R,S)-5 α -spirostan-3 β -ol-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl(1-2)- β -D- glucopyranosyl(1-4)- β - <i>O</i> -galactopyranoside (Terrestrosina A).....	27
(9)	(25R,S)-5 α -spirostan-3 β -ol-3- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl(1-4)-[α -L- rhamnopyranosyl(1-2)]- β -D-galactopyranoside (Terrestrosina B)	27
(10)	(25R,S)-5 α -spirostan-12-on-3 β -ol-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl(1-2)- β - D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-galactopyranoside (Terrestrosina C).....	27
(11)	3- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl(1-2)-[β -D-xylopyranosyl(1-3)]- β -D- glucopyranosyl(1-4)- β -D-galactopyranoside (Terrestrosina D).....	27
(12)	(25R,S)-5 α -spirostane-2 α ,3 β -diol-3- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl(1-2)- β - D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-galactopyranoside (Terrestrosina E).....	27
(13)	26- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl (25R)-furostane-2 α ,3 β ,22 α ,26-tetrol-3- <i>O</i> - β - D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 4)- β - <i>O</i> -galactopyranoside (Terrestrosina F)	28
(14)	26- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyl (25 R,S)-5 α -furostane-2 α ,3 β ,22 α ,26-tetrol- 3- <i>O</i> - β -D-galactopyranosyl(1-2)- β -D-gluco-pyranosyl(1-4)- β -D- galactopyranoside (Terrestrosina G)	28

(15)	26- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl (25R,S)-5α-furostane-3β,22α,26-triol-3- <i>O</i> -β-D-galactopyranosyl(1-2)-β-D-glucopyranosyl(1-4)-β-D-galactopyranoside (Terrestrosina H)	28
(16)	26- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl (25R,S)-5α-furostan-12-one-3β,22α,26-triol-3- <i>O</i> -β-D-galactopyranosyl(1-2)-β-D-glucopyranosyl(1-4)-β-D-galactopyranoside (Terrestrosina I)	28
(17)	26- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl (25R,S)-furost-5-ene-3β,22α,26-triol-3- <i>O</i> -β-D-galactopyranosyl(1-2)-β-D-glucopyranosyl(1-4)-β-D-galactopyranoside (Terrestrosina J).....	28
(18)	26- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl(25R)-5α-furost-20(22)-en-12-one-3β,26-diol-3- <i>O</i> -β-D-galactopyranosyl(1-2)-β-D-glucopyranosyl(1-4)-β-D-galactopyranoside (Terrestrosina K)	28
(19)	25R-5α-Spirostan-3β-ol (Tigogenina).....	28
(20)	25R-5α-Spirostan-2α,3β-diol (Gitogenina)	28
(21)	25R-5α-Spirostan-12-one (Hecogenina).....	29
(22)	25S-5α-Spirostan-12-one (Neohecogenina)	29
(23)	Quercetina.....	29
(24)	Rutina	30
(25)	Quercetina 3- <i>O</i> -glicosídeo.....	30
(26)	Quercetina 3- <i>O</i> -rutinosídeo	30
(27)	Kaempferol 3- <i>O</i> -glicosídeo	30
(28)	Harmana	31
(29)	Harmina.....	31
(30)	Norharmana	32
(31)	Terrestribisamide	32
(32)	25R-spirost-4-en-3,12-dione.....	32
(33)	Tribulusterine.....	33

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO..... 15
2	REFERENCIAL TEÓRICO..... 17
2.1	Descrição da espécie 17
2.2	Propriedades farmacológicas de <i>Tribulus terrestris</i>..... 18
2.3	Química de <i>Tribulus terrestris</i> 23
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS 33
	REFERÊNCIAS 34
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS 43
	ARTIGO 1 Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i> L..... 43
	ARTIGO 2 Qualidade espermática e histomorfometria dos testículos de ratos Wistar suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i> L. 66
	ANEXOS 89

1 INTRODUÇÃO

O uso de suplementos nutricionais bem como de drogas com propósito ergogênico e puramente estético cresce a cada dia entre indivíduos esportistas e na população em geral. A promessa de resultados mais rápidos no ganho de massa muscular, definição corporal, redução de gordura e de peso, aceleração do metabolismo ou melhora do desempenho sexual vem contribuindo para o uso abusivo dessas substâncias (BRASIL, 2013; HIRSCHBRUCH; FISBERG; MOCHIZUKI, 2008).

Os estudos têm sido convergentes em relação às alterações favoráveis na composição corporal e a influência positiva sobre o condicionamento físico e desempenho atlético após o manejo dietético, através do uso da suplementação alimentar para casos específicos (HERNANDEZ; NAHAS, 2009).

No entanto, esse uso aumentado de suplementos nutricionais abre espaço para a utilização indevida dos mesmos. Parece ser comum que as doses recomendadas sejam excedidas podendo trazer riscos à saúde. O consumo em excesso de aminoácidos, por exemplo, pode interferir na absorção ocasionando distúrbios gastrointestinais e desequilíbrio no metabolismo. O uso de creatina pode acarretar possíveis efeitos indesejáveis como problemas da função renal e hepática. A ingestão de cafeína pode resultar em náuseas, tremores musculares, taquicardia e cefaleia (ALVES; LIMA, 2009; FERREIRA et al., 2008).

Dentro deste contexto, pesquisas têm sido realizadas a fim de validar soluções alternativas e com menos efeitos indesejáveis para melhorar o desempenho atlético e a performance sexual e uma delas consiste no uso de plantas medicinais como a espécie *Tribulus terrestris* L. (LEMOS JÚNIOR; LEMOS; LEMOS, 2011; POKRYWKA et al., 2014).

A diversidade de substâncias ativas em plantas medicinais tem motivado o desenvolvimento de pesquisas envolvendo o uso de extratos vegetais. Os

compostos químicos dos extratos vegetais possuem atividades biológicas importantes para a saúde humana podendo servir como suplementos dietéticos melhorando o condicionamento físico. Além disso, os extratos vegetais apresentam algumas vantagens sobre as drogas sintéticas. Eles são potencialmente menos tóxicos que os compostos sintéticos, por serem menos concentrados. Com isso, sofrem biodegradação rápida e podem possuir múltiplos modos de ação, com amplo espectro de uso e ação seletiva (COIMBRA et al., 2006; VENTUROSOSO et al., 2011).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características bioquímicas e reprodutivas de ratos Wistar machos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* L.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Descrição da espécie

O *Tribulus terrestris* L. pertence à família Zygophyllaceae e é comumente conhecido por vários nomes como tribulus, abrolhos, viagra natural, videira da punctura, espinho do diabo, espinho de três pontas, videira amarela, cabeça de touro, cabeça de bode, *caltrop*, *gokhru*, *goksura*, entre outros (HAMMODA et al., 2013; KOSTOVA; DINCHEV, 2005). A espécie é originária da Índia, porém, atualmente, está amplamente distribuída em regiões quentes, secas e arenosas em todo o mundo podendo ser encontrada na Turquia, China, Japão, Coréia, parte ocidental da Ásia, sul da Europa, África (SAHIN; DURU, 2010), Estados Unidos, México (HUSSAIN et al., 2009), Austrália, Espanha e Bulgária (ASHOKKUMAR et al., 2014).

O *Tribulus terrestris* é uma erva anual de até dois metros de comprimento com folhas pequenas e opostas distribuídas em pares. Floresce na primavera e no verão, apresentando flores pequenas e amarelas (oito a quinze milímetros de diâmetro), com cinco pétalas cada uma. As sementes são em formato de estrela, de cinco a sete milímetros de comprimento e de cinco a seis milímetros de largura. Cada planta pode conter até duas mil sementes. Cresce em todo o tipo de terreno, como estradas e terrenos baldios sendo considerada uma planta invasora de áreas cultiváveis (HASHIM et al., 2014; SAMY et al., 2013).

Sua raiz possui de 7 a 18 cm de comprimento e 0,3 a 0,7 cm de diâmetro: é cilíndrica, fibrosa, frequentemente ramificada com pequenas radículas, resistente, lenhosa e de cor amarela ao marrom claro, superfície áspera devido à presença de pequenos nódulos, odor aromático, sabor adocicado e adstringente (FARMACOPEIA..., 2001).

O fruto (Figura 1) tem coloração amarelo claro, possui cinco nervuras, um centímetro de diâmetro e cerca de 0,5 cm de comprimento, é mais ou menos esférico e possui espículas proeminentes, duras e curtas, contendo quatro ou mais sementes e sabor ligeiramente adstringente (FARMACOPEIA..., 2001).



Figura 1 Fruto de *Tribulus terrestris* L.
(Fonte: Arquivo pessoal)

2.2 Propriedades farmacológicas de *Tribulus terrestris*

O *Tribulus terrestris* vem sendo utilizado popularmente para diversos fins terapêuticos, o que tem despertado o interesse de pesquisadores em todo o mundo (YABESH; PRABHU; VIJAYAKUMAR, 2014). O consumo anual de *Tribulus terrestris* pelas indústrias de ervas indianas tem sido estimado em cerca de 5.000 toneladas e é uma das 178 plantas medicinais mais comercializadas na Índia (BALASUBRAMANI et al., 2010).

Na medicina tradicional chinesa e indiana, o fruto é utilizado em decocções e infusões como tônico, afrodisíaco, diurético, anti-inflamatório, no tratamento de edemas, patologias oftálmicas e cardiovasculares, no tratamento

da infertilidade, impotência, disfunção erétil e baixa libido (KANG et al., 2014; LIU et al., 2014; NIKAM; EBRAHIMI; PATIL, 2009).

Estudos farmacológicos comprovam que a espécie tem atividade afrodisíaca (GAUTHAMAN; ADAIKAN; PRASAD, 2002; GAUTHAMAN; GANESAN, 2008; GAUTHAMAN; GANESAN; PRASAD, 2003; SINGH; GUPTA, 2011), anti-helmíntica (DEEPAK et al., 2002), diurética (AL-ALI et al., 2003), anti-hipertensiva (PHILLIPS; MATHEW; ORIOWO, 2006; SHARIFI; DARABI; AKBARLOO, 2003), antifúngica (ZHANG et al., 2005, 2006), antidiabética (AMIN et al., 2006), analgésica (HEIDARI et al., 2007), hipocolesterolêmica (GRIGOROVA et al., 2008; TUNCER et al., 2009), antibacteriana (HUSSAIN et al., 2009; MOHAMMED et al., 2010), antilíticas (AGGARWAL et al., 2010, 2012; ARASARATNAM et al., 2010), hepatoprotetora (ANSARI et al., 2013; KAVITHA et al., 2011), antioxidante (ZHELEVA-DIMITROVA; OBRESHKOVA; NEDIALKOV, 2012), antitumoral (KESHTMAND et al., 2014; SISTO et al., 2012) e antidepressiva (WANG et al., 2013).

Graças a essas diversas propriedades farmacológicas, o *Tribulus terrestris* L. consta em monografias das Farmacopeias Ayurvédica Indiana (FARMACOPEIAS..., 2001), Chinesa (FARMACOPEIAS..., 2010) e Japonesa (FARMACOPEIAS..., 2011). Segundo descrito na Farmacopeia Ayuverdica Indiana (FARMACOPEIAS..., 2001), o fruto pode ser utilizado na forma de pó na dose de 3 a 6 gramas por dia ou em decocções na dose de 20 a 30 gramas por dia.

Alguns autores afirmam que o principal efeito farmacológico do *Tribulus terrestris* é aumentar os níveis dos hormônios androgênicos tais como testosterona, dihidrotestosterona e dehidroepiandrosterona em primatas (*Papio anubis* e *Macaca mullata*), coelhos e ratos e sugerem que a planta pode ser útil

em casos leves ou moderados de disfunção erétil (GAUTHAMAN; GANESAN, 2008).

Turan e Cek (2007) verificaram que a administração da dose de 9g/30L de água do extrato de *Tribulus terrestris* três vezes ao dia durante 30 dias promoveu a masculinização de peixes (*Clarias gariepinus*), pois a planta foi eficaz em aumentar o percentual de peixes machos.

Estudos realizados por Bashir et al. (2009) encontraram aumento significativo do peso dos testículos de ratos púberes tratados com dose única de 70 mg/kg/dia do extrato de *Tribulus terrestris* durante 20 dias. Os cortes histológicos dos testículos mostraram que no grupo experimental ocorreu um aumento significativo no volume e diâmetro dos túbulos seminíferos o que sugere que a planta estimula a espermatogênese. Assim, os autores sugeriram que a espécie pode ser utilizada no tratamento da infertilidade ou em casos de atraso na puberdade.

Kavitha, Ramesh e Subramanian (2012) demonstraram que o extrato etanólico de *Tribulus terrestris* também é capaz de estimular a espermatogênese em peixes. Os autores administraram diferentes concentrações (0, 100, 150, 200, 250 ou 350mg/L do extrato em peixes (*Poecilia latipinna*) durante 60 dias. A planta promoveu a masculinização dos animais de maneira dependente de concentração. Além disso, a análise histológica dos testículos mostrou a presença de todas as fases da espermatogênese.

Um estudo com quatro diferentes extratos (etanólico, metanólico, acetoneitrila e hexânico) obtidos de *Tribulus terrestris* colhido durante a floração apresentaram eficácia em aumentar o nível de testosterona livre no soro de camundongos machos na dose de 20mg/kg durante 45 dias, sendo o extrato metanólico o que apresentou o efeito mais significativo (HUSSAIN et al., 2009).

Elahi, Asl e Shahian (2013) avaliaram que a administração das doses de 5mg/kg ou 10mg/kg por dia do extrato de *Tribulus terrestris* em ratos Wistar

machos durante 8 semanas promove uma melhoria da qualidade espermática. Os autores sugeriram que a planta pode ser utilizada no tratamento da infertilidade masculina, pois eles encontraram uma maior concentração de espermatozoides, assim como melhoria na viabilidade espermática (integridade da membrana plasmática), redução do percentual de células mal formadas (morfologia) e aumento do percentual de espermatozoides móveis (motilidade).

Um estudo demonstrou o efeito da dose de 10mg/kg de uma preparação fitoterápica da Bulgária à base de *Tribulus terrestris* sobre o teor de colesterol sérico total e sua influência sobre a qualidade do sêmen de mini galos. O resultado da análise do sêmen mostrou uma melhora em sua qualidade: aumento do volume do ejaculado e aumento da concentração e motilidade dos espermatozoides. O efeito positivo deste fitoterápico sobre o teor de colesterol total também foi detectado no soro dos mini galos apresentando um percentual 9,24% menor quando comparado com o grupo controle (GRIGOROVA et al., 2008).

O *Tribulus terrestris* também é capaz de melhorar os parâmetros metabólicos promovendo alterações na composição corporal em humanos proporcionando ganho de massa muscular devido a seus efeitos anabólicos (POKRYWKA et al., 2014). Milasius et al. (2010) avaliaram a influência de um suplemento à base de *Tribulus terrestris* sobre o condicionamento físico e desempenho atlético em atletas através da ingestão de uma cápsula (625 mg) pela manhã e duas cápsulas (1250 mg) à noite durante 20 dias. Os autores concluíram que *Tribulus terrestris* influencia positivamente a capacidade anaeróbica e aeróbica, promove a melhoria da capacidade cardiorrespiratória, bem como aumenta os níveis de testosterona.

Assim, de acordo com os estudos supracitados, *Tribulus terrestris* possui diversas propriedades farmacológicas como atividade androgênica e ações sobre o anabolismo celular tanto na espécie humana quanto em animais. No entanto,

alguns estudos contradizem esses efeitos, mostrando não haver efeitos quando administrados extratos vegetais ou preparações fitoterápicas obtidas a partir dessa espécie.

De acordo com Antonio et al. (2000), a ingestão de cápsulas contendo uma preparação fitoterápica à base de *Tribulus terrestris* na dose de 3,21mg/kg/dia por homens submetidos a treino de resistência física não promove diferenças significativas na composição corporal nem melhorias no condicionamento físico.

Uma pesquisa realizada por Neychev e Mitev (2005) avaliaram os possíveis efeitos androgênicos de um fitoterápico de origem da Bulgária à base de *Tribulus terrestris* em homens saudáveis nas doses de 0, 10 ou 20 mg/kg/dia. Os autores encontraram que não houve diferenças significativas nos níveis dos hormônios testosterona, androstenediona e hormônio luteinizante mensurados no soro 24 horas antes e 24, 72, 240, 408 e 576 horas depois do início da administração da espécie.

Outro estudo que também não encontrou efeitos benéficos com a suplementação com *Tribulus terrestris* foi realizado por Rogerson et al. (2007). Atletas de elite de *Rugby* submetidos à suplementação com uma cápsula (450mg) por dia de *Tribulus terrestris* durante 5 semanas não apresentaram alterações na massa muscular magra nem aumento das taxas de excreção urinária de testosterona/epitesterona. No entanto, esses atletas apresentaram aumento da gordura corporal.

Resultados de um trabalho com homens saudáveis a partir de 40 anos, com disfunção erétil, mas sem estar em tratamento, não fumantes, sem dislipidemia, e em caso de hipertensão e/ou diabetes deveriam estar controladas sugeriu que a planta não tem efeitos sobre a disfunção erétil. O ensaio forneceu duas vezes ao dia cápsulas contendo 400 mg de extrato seco de *Tribulus terrestris* durante 30 dias. Os autores avaliaram a função erétil e os níveis séricos

de testosterona e reportaram que os grupos controle (placebo) e experimental foram estatisticamente equivalentes em todos os aspectos da avaliação (SANTOS et al., 2014).

Sahin e Duru (2010) também sugeriram que a administração de um suplemento comercial à base de *Tribulus terrestris* não possui efeitos sobre o crescimento de frangos bem como sobre o desenvolvimento muscular. Esta avaliação forneceu 180 ou 360 ppm do extrato misturado à dieta basal de milho e soja até o 42º dia de vida dos frangos. A expectativa deste estudo era de que a planta aumentasse a taxa de crescimento dos frangos, porém isso não ocorreu.

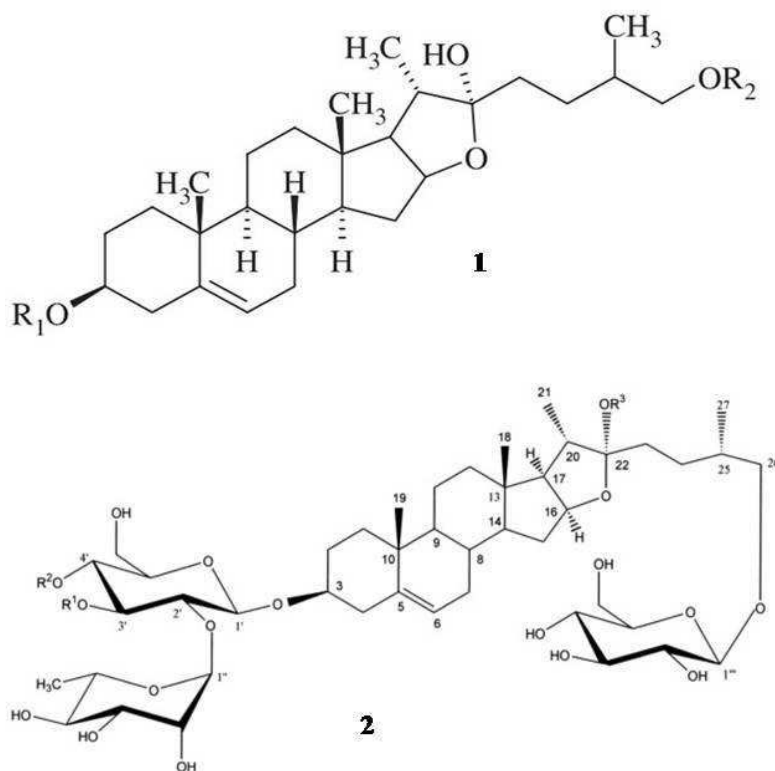
Assim, é possível que as razões que levem alguns autores a não obterem êxito com a administração de *Tribulus terrestris* seja devido a limitações dos estudos como um reduzido tamanho amostral ou a ausência de padronização da droga vegetal, pois nas preparações fitoterápicas à base desta planta tem se percebido a utilização de todas as partes da espécie (SANTOS et al., 2014).

2.3 Química de *Tribulus terrestris*

Existe uma grande variação na quantidade dos componentes fitoquímicos encontrados em amostras de *Tribulus terrestris* de regiões diferentes. Sabe-se que as condições geográficas, a região de coleta, as características do solo, entre outras, influenciam indiretamente na biossíntese dos metabólitos secundários. A quantidade destes componentes também depende da parte da planta utilizada. Entre os constituintes que contribuem para a sua atividade biológica estão, principalmente, saponinas, flavonoides e alcaloides (HAMMODA et al., 2013; KUMAR; BHARDWAJ, 2012).

A presença de saponinas esteroidais do tipo espirostano e furostano é uma característica desta espécie, sendo este último tipo considerado como precursor biogénico do seu análogo espirostano (KOSTOVA; DINCHEV,

2005). De acordo com vários estudos, protodioscina (furostano) **(1)** e protogracillina **(2)** são as principais saponinas presentes no extrato etanólico das partes aéreas de *Tribulus terrestris* da Bulgária sendo responsáveis por suas atividades farmacológicas mais importantes (KOSTOVA et al., 2002).



Ganzera, Bedir e Khan (2001) analisaram o conteúdo de saponinas esteroidais em extratos aquoso e acetonitrila obtidos de *Tribulus terrestris* de origem da Bulgária, Índia e China. Os resultados mostraram grandes variações não apenas na composição, mas também na quantidade de saponinas dependendo da região geográfica de coleta. Nas amostras provenientes da Bulgária foram encontradas de 0,245-1,337% de protodioscina. As amostras provenientes da China possuíam pequena (0,063 e 0,089%) ou nenhuma

quantidade desta saponina. A protodioscina estava ainda em menor quantidade (0,024 %) na amostra da Índia.

Nessa mesma investigação, os autores também analisaram alguns fitoterápicos. O medicamento produzido na Bulgária mostrou novamente o maior conteúdo de protodioscina (6,49%), enquanto os outros dois (origem não especificada) foram significativamente menores (0,85 e 0,17%). Com base nestes resultados, os autores sugeriram a presença de quimiotipos diferentes de *Tribulus terrestris* (GANZERA; BEDIR; KHAN, 2001).

Acredita-se que as saponinas como a protodioscina podem aumentar a produção endógena de hormônios androgênicos pelo aumento do hormônio luteinizante (LH) liberado pela hipófise. Alternativamente, tem sido proposto que os compostos ativos de *Tribulus terrestris* pode ser enzimaticamente convertidos em andrógenos fracos como a dehidroepiandrosterona (DHEA), que poderia ser convertida em hormônios androgênicos mais potentes como a testosterona nas gônadas e tecidos periféricos (ANDRADE et al., 2002; GAUTHAMAN; ADAIKAN, 2005).

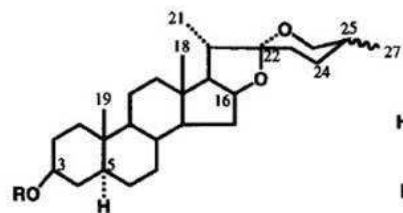
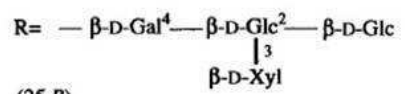
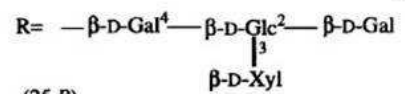
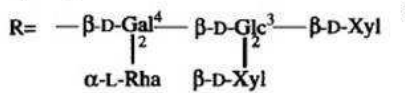
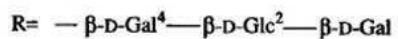
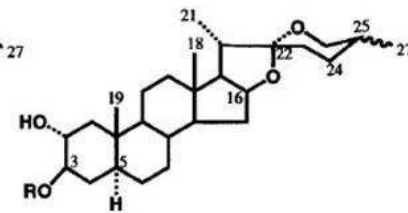
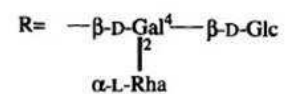
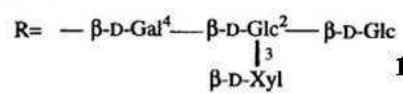
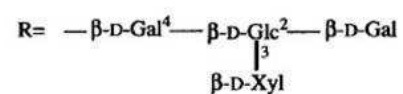
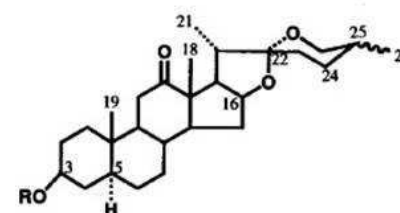
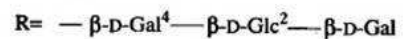
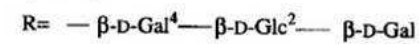
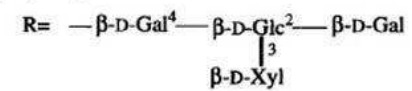
No extrato metanólico obtido dos frutos de *Tribulus terrestris* foram isolados e caracterizados dez saponinas esteroidais: Desgalactotigonina (**3**), F-gitonina (**4**), Gitonina (**5**), Desglucolanatigonina (**6**), Tigogenina 3-*O*- β -D-xylopyranosyl(1-2)-[β -D-xylopyranosyl(1-3)]- β -D-glucopyranosyl(1-4)-[α -L-rhamnopyranosyl(1-2)]- β -D-galactopyranoside (**7**), (25R,S)-5 α -spirostan-3 β -ol-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1-2)- β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -*O* galactopyranoside (Terrestrosina A) (**8**), (25R,S)-5 α -spirostan-3 β -ol-3-*O*- β -D-glucopyranosyl(1-4)-[α -L-rhamnopyranosyl(1-2)]- β -D-galactopyranoside (Terrestrosina B) (**9**), (25R,S)-5 α -spirostan-12-on-3 β -ol-3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1-2)- β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-galactopyranoside (Terrestrosina C) (**10**), 3-*O*- β -D-galactopyranosyl(1-2)-[β -D-xylopyranosyl(1-3)]- β -D-glucopyranosyl(1-4)- β -D-galactopyranoside (Terrestrosina D) (**11**) e (25R,S)-5 α -spirostane-2 α ,3 β -diol-3-

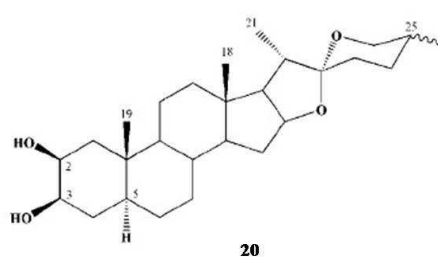
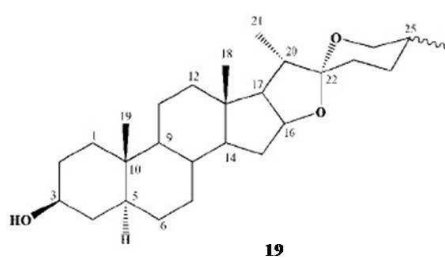
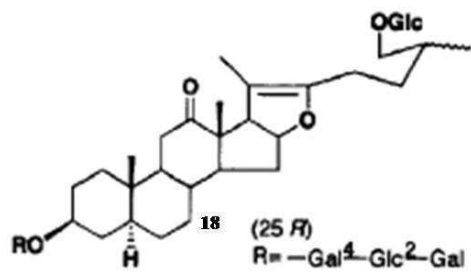
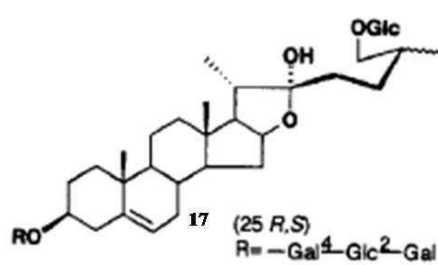
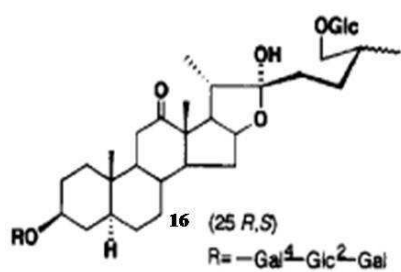
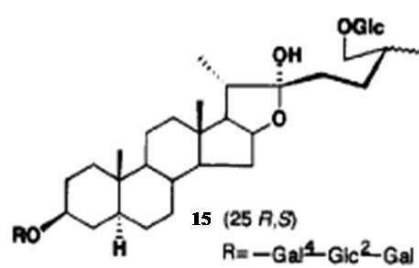
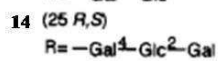
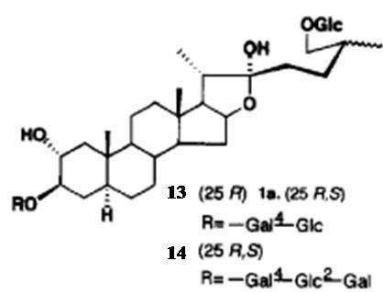
O-β-D-galactopyranosyl(1-2)-β-D-glucopyranosyl(1-4)-β-D-galactopyranoside (Terrestrosina E) **(12)** (YAN et al., 1996).

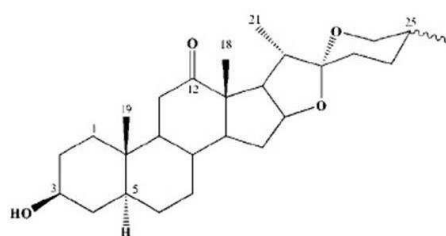
No extrato etanólico obtido dos frutos de *Tribulus terrestris*, Yan et al. (1997) isolaram seis novas saponinas esteroidais do tipo furostano 26-*O*-β-D-glucopyranosyl (25R)-furostane-2α,3β,22α,26-tetrol-3-*O*-β-D-glucopyranosyl (1→4)-β-*O*-galactopyranoside (Terrestrosina F) **(13)**, 26-*O*-β-D-glucopyranosyl (25 R,S)-5α-furostane-2α,3 β,22α,26-tetrol-3-*O*-β-D-galactopyranosyl(1-2)-β-D-gluco-pyranosyl(1-4)-β-D-galactopyranoside (Terrestrosina G) **(14)**, 26-*O*-β-D-glucopyranosyl (25R,S)-5α-furostane-3β,22α,26-triol-3-*O*-β-D-galactopyranosyl(1-2)-β-D-glucopyranosyl(1-4)-β-D-galactopyranoside (Terrestrosina H) **(15)**, 26-*O*-β-D-glucopyranosyl (25R,S)-5α-furostan-12-one-3β,22α,26-triol-3-*O*-β- D- galacto-pyranosyl(1-2)-β-D-glucopyranosyl(1-4)-β-D-galacto-pyranoside (Terrestrosina I) **(16)**, 26-*O*-β-D-glucopyranosyl (25R,S)-furost-5-ene-3β,22α,26-triol-3-*O*-β-D-galactopyranosyl(1-2)-β-D-gluco-pyranosyl(1-4)-β-D-galactopyranoside (Terrestrosina J) **(17)**, 26-*O*-β-D-glucopyranosyl(25R)-5α-furost-20(22)-en-12-one-3β,26-diol-3-*O*-β-D-galactopyranosyl(1-2)-β-D-glucopyranosyl(1-4)-β-D-galactopyranoside (Terrestrosina K) **(18)** (YAN et al., 1997).

No extrato etanólico de *Tribulus terrestris* foram identificadas quatro saponinas esteroidais 25R-5α-Spirostan-3β-ol (Tigogenina) **(19)**, 25R-5α-Spirostan-2α,3β-diol (Gitogenina) **(20)**, 25R-5α-Spirostan-12-one (Hecogenina) **(21)** e 25S-5α-Spirostan-12-one (Neohecogenina) **(22)** (LI et al., 2009).

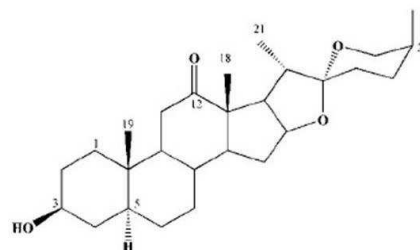
Outra classe de substâncias frequentes em *Tribulus terrestris* são os flavonoides. Patil et al. (2012) encontraram altas quantidades de quercetina **(23)** no fruto de *Tribulus terrestris* coletado em Maharashtra na Índia: 601,3 mg/g de amostra seca no extrato etanólico e 452,7 mg/g de amostra seca no extrato acetona.

**3:** (25 *R*)**6:** (25 *R*)**7:** (25 *R*)**8:** (25 *R,S*)**9:** (25 *R,S*)**4:** (25 *R*)**5:** (25 *R*)**12:** (25 *R,S*)**10:** (25 *R,S*)**11:** (25 *R*)

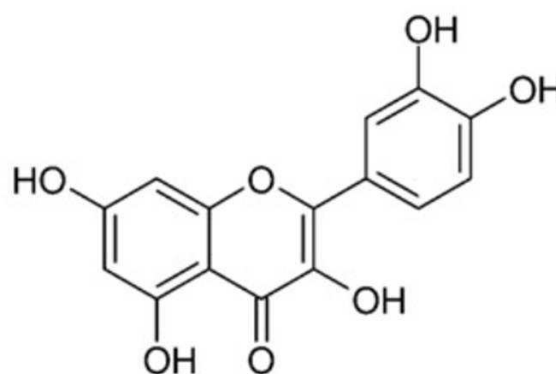




21



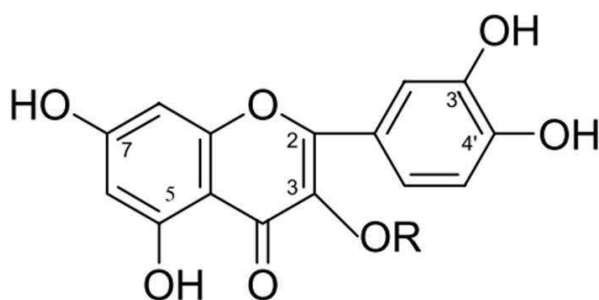
22



23

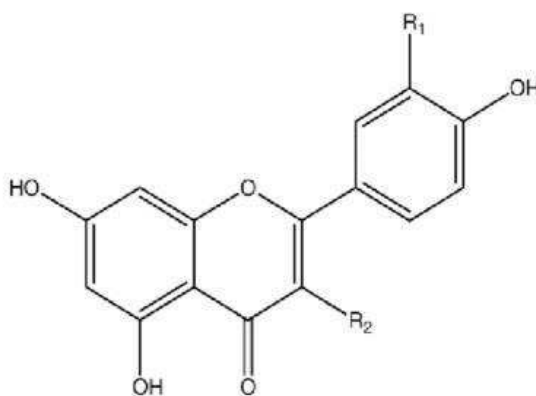
Kumar (2012) verificou a presença de 18 a 28 flavonoides no extrato metanólico dos frutos ou folhas de *Tribulus terrestris* coletados em seis regiões diferentes do Norte da Índia: Patiala, Delhi, Meerut, Muzaffarnagar, Baghpat e Haridwar. Os dois flavonoides majoritários encontrados foram quercetina, presente em todas as amostras, e rutina (**24**). Além disso, os resultados mostraram diferentes proporções nas quantidades dependendo da região de coleta sendo encontrado o conteúdo máximo de quercetina de 61,41, 41,36 e 44,37 $\mu\text{g/g}$ em populações de Muzaffarnagar, Patiala e Meerut, respectivamente, enquanto que na população de Delhi foi encontrado o menor percentual de quercetina (38,77 $\mu\text{g/g}$). Para a rutina, o valor máximo encontrado foi 0,2212%

na amostra de Haridwar, enquanto que nas amostras de Delhi novamente foi obtida a quantidade mínima de 0,0612% de rutina.



24

Do extrato metanólico das partes aéreas de *Tribulus terrestris* L. var. *orientalis* (Kerner) G. Beck foram isolados três novos flavonoides e estes foram baseados em quercetina e kaempferol. Os compostos foram quercetina 3-O-glicosídeo (**25**), quercetina 3-O-rutinosídeo (**26**) e kaempferol 3-O-glicosídeo (**27**) (YEKTA et al., 2008).

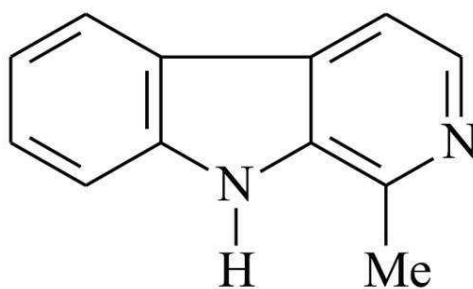
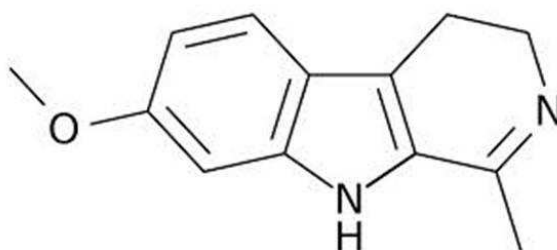


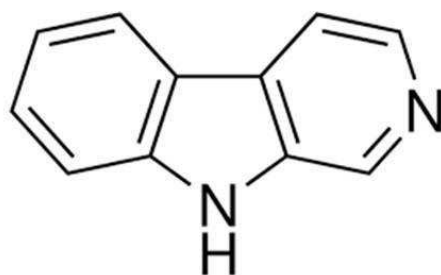
25 R₁: OH R₂: Glicose

26 R₁: OH R₂: Rutinose

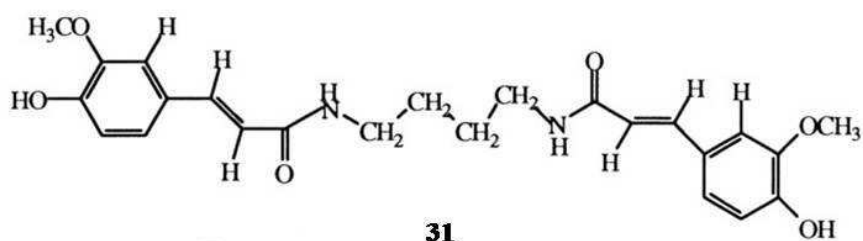
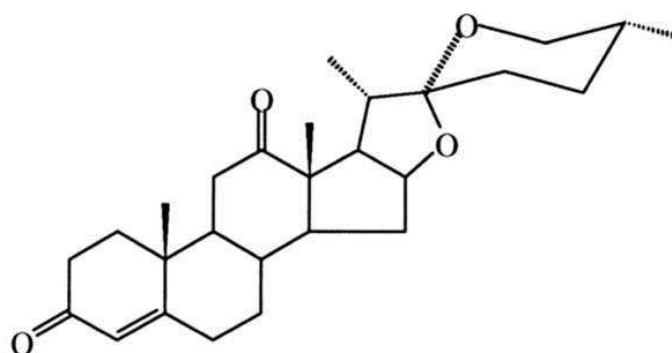
27 R₁: H R₂: Glicose

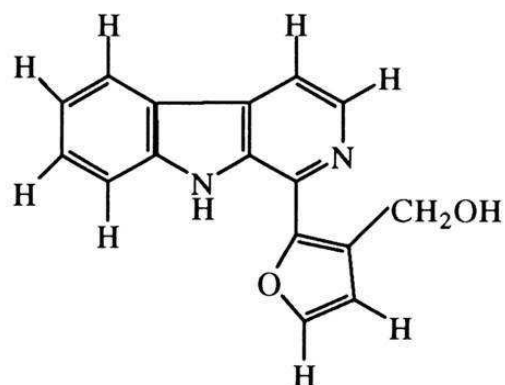
A presença de alcaloides também já foi relatada para a espécie *Tribulus terrestris*. Os primeiros alcaloides identificados foram obtidos das partes aéreas da espécie e trata-se dos alcaloides β -carbolínicos: harmana (**28**) e harmina (**29**) (BORKOWSKI; LUTOMSKI, 1960). Posteriormente, Bourke, Stevens e Carrigan (1992) administraram o extrato metanólico obtido das partes aéreas de *Tribulus terrestris* em ovelhas e relataram efeitos tóxicos como distúrbios neurológicos e dificuldades de locomoção. Os alcaloides identificados nas frações foram harmana (**28**) e norharmana (**30**) (44mg/Kg de amostra seca) e eles seriam os responsáveis pela toxicidade aos animais.

**28****29**

**30**

Wu, Shi e Kuo (1999) isolaram e caracterizaram a partir do extrato metanólico obtido dos frutos secos de *Tribulus terrestris* três novos compostos: terretribisamide (**31**), 25R-spirost-4-en-3,12-dione (**32**) e tribulusterine (**33**).

**31****32**



33

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o exposto, observa-se que a espécie *Tribulus terrestris* L. promove alterações benéficas sobre os parâmetros metabólicos e reprodutivos em humanos e animais, isso ocorre pela presença de compostos químicos, principalmente, as saponinas esteroidais. Portanto, visto que se trata de uma planta que vem sendo alvo de enorme interesse atualmente, são necessários mais estudos para elucidar a eficácia e a segurança terapêutica, pois estas ainda são incertas e controversas.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, A. et al. Diminution of oxalate induced renal tubular epithelial cell injury and inhibition of calcium oxalate crystallization in vitro by aqueous extract of *Tribulus terrestris*. **International Brazilian Journal of Urology**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 480-488, 2010.

AGGARWAL, A. et al. A novel antilithiatic protein from *Tribulus terrestris* having cytoprotective potency. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, v. 19, n. 8, p. 812-819, 2012.

AL-ALI, M. et al. *Tribulus terrestris*: preliminary study of its diuretic and contractile effects and comparison with *Zea mays*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 85, n. 2/3, p. 257-260, 2003.

ALVES, C.; LIMA, R. V. B. Dietary supplement use by adolescents. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 287-294, 2009.

AMIN, A. M. R. et al. The protective effect of *Tribulus terrestris* in diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1084, n. 1, p. 391-401, 2006.

ANDRADE, A. J. M. et al. Reproductive effects of deltamethrin on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Duluth, v. 36, n. 3, p. 310-317, Dec. 2002.

ANSARI, J. A. et al. Hepatoprotective effect of *Tribulus terrestris* L. against Acetaminophen induced liver damage in Wistar rats. **Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology**, New Delhi, v. 3, n. 1, p. 15-18, 2013.

ANTONIO, J. et al. The effects of *Tribulus terrestris* on body composition and exercise performance in resistance-trained males. **International Journal Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, Champaign, v. 10, n. 2, p. 208-215, 2000.

ARASARATNAM, V. et al. A study of *Tribulus terrestris* extract on risk factors for urinary stone in normal subjects and urolithic patients. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, Sri Lanka, v. 38, n. 3, p. 187-191, July 2010.

ASHOKKUMAR, S. et al. Synthesis, characterization and catalytic activity of silver nanoparticles using *Tribulus terrestris* leaf extract. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, London, v. 121, n. 1, p. 88-93, Mar. 2014.

BALASUBRAMANI, S. P. et al. Development of ITS sequence based molecular marker to distinguish *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) from its adulterants. **Fitoterapia**, Milano, v. 81, n. 6, p. 503-508, 2010.

BASHIR, A. et al. Effects of *Tribulus terrestris* on testicular development of immature albino rats. **Biomedica**, Bogota, v. 25, n. 5, p. 63-68, Jan./June 2009.

BORKOWSKI, B.; LUTOMSKI, J. Chromatographic examination of the alkaloid fraction from the herb and seeds of *Tribulus terrestris*. **Biuletyn Instytutu Roslin Lecznicych**, Poznan, v. 6, p. 220-227, 1960.

BOURKE, C. A.; STEVENS, G. R.; CARRIGAN, M. J. Locomotor effects in sheep of alkaloids identified in Australian *Tribulus terrestris*. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 69, n. 7, p. 163-165, July 1992.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consumo e saúde “suplemento alimentar”**. Brasília, 2013. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

COIMBRA, J. L. et al. Toxicidade de extratos vegetais a *Scutellonema bradys*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 7, p. 1209-1211, jul. 2006.

DEEPAK, M. et al. Tribulosin and beta-sitosterol-D-glucoside, the anthelmintic principles of *Tribulus terrestris*. **Phytomedicine**, Jena, v. 9, p. 753-756, 2002.

ELAHI, R. K.; ASL, S.; SHAHIAN, F. Study on the effects of various doses of *Tribulus terrestris* extract on epididymal sperm morphology and count in rat. **Global Veterinaria**, Deira, v. 10, n. 1, p. 13-17, 2013.

FARMACOPEIA Ayurvédica Indiana. New Delhi: Government of India, Ministry of Health & Family Welfare, 2001. v. 1, 171 p.

FARMACOPEIA da República Popular da China. Pequim: Comissão da Farmacopeia Chinesa, 2010. v. 1.

FARMACOPEIA Japonesa. 16. ed. Tokyo, 2011. 2326 p.

FERREIRA, C. F. S. et al. Uso de suplementos nutricionais por adolescentes em academias do interior e de São Paulo capital. **Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, São Paulo, v. 2, n. 10, p. 154-165, 2008.

GANZERA, M.; BEDIR, E.; KHAN, I. A. Determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by reversed-phase high-performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 90, n. 11, p. 1752-1758, 2001.

GAUTHAMAN, K.; ADAIKAN, P. G. Effect of *Tribulus terrestris* on nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase activity and androgen receptors in rat brain. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 96, n. 1/2, p. 127-132, 2005.

GAUTHAMAN, K.; ADAIKAN, P. G.; PRASAD, R. N. V. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. **Life Sciences**, Elmsford, v. 71, n. 12, p. 1385-1396, 2002.

GAUTHAMAN, K.; GANESAN, A. P. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction: an evaluation using primates, rabbit and rat. **Phytomedicine**, Jena, v. 15, n. 1/2, p. 44-54, Jan. 2008.

GAUTHAMAN, K.; GANESAN, A. P.; PRASAD, R. N. Sexual effects of puncturevine (*Tribulus terrestris*) extract (Protodioscin): an evaluation using a rat model. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, New York, v. 9, n. 2, p. 257-65, 2003.

GRIGOROVA, S. et al. Effect of *Tribulus terrestris* extract on semen quality and serum total cholesterol content in white plymouth rock-mini cocks. **Biotechnology in Animal Husbandry**, Belgrade, v. 24, n. 3/4, p. 139-146, 2008.

HAMMODA, H. M. et al. Chemical constituents from *Tribulus terrestris* and screening of their antioxidant activity. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 92, n. 1, p. 153-159, Aug. 2013.

HASHIM, S. et al. Medicinal properties, phytochemistry and pharmacology of *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae). **Pakistan Journal of Botany**, Karachi, v. 46, n. 1, p. 399-404, 2014.

HEIDARI, M. R. et al. The analgesic effect of *Tribulus terrestris* extract and comparison of gastric ulcerogenicity of the extract with indomethacine in animal experiments. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1095, n. 1, p. 418-427, 2007.

HERNANDEZ, A. J.; NAHAS, R. M. Modificações dietéticas, reposição hídrica, suplementos alimentares e drogas: comprovação de ação ergogênica e potenciais riscos para a saúde. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 3-12, maio/jun. 2009.

HIRSCHBRUCH, M. D.; FISBERG, M.; MOCHIZUKI, L. Consumo de suplementos por jovens frequentadores de academias de ginástica em São Paulo. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 14, n. 6, p. 539-543, 2008.

HUSSAIN, A. A. et al. Study the biological activities of *Tribulus terrestris* extracts. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, Las Cruces, v. 3, n. 9, p. 413-415, Sept. 2009.

KANG, L. P. et al. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 107, n. 1, p. 182-189, Nov. 2014.

KAVITHA, P. et al. Hepatoprotective activity of *Tribulus terrestris* extract against acetaminophen-induced toxicity in a freshwater fish (*Oreochromis mossambicus*). **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, New York, v. 47, n. 10, p. 698-706, 2011.

KAVITHA, P.; RAMESH, R.; SUBRAMANIAN, P. Histopathological changes in *Poecilia latipinna* male gonad due to *Tribulus terrestris* administration. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, New York, v. 48, n. 5, p. 306-312, 2012.

KESHTMAND, Z. et al. Protective effect of *Tribulus terrestris* hydroalcoholic extract against cisplatin-induced cytotoxicity on sperm parameters in male mice. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 32, n. 2, p. 551-557, 2014.

KOSTOVA, I.; DINCHEV, D. Saponins in *Tribulus terrestris*: chemistry and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, Berlin, v. 4, n. 2/3, p. 111-137, July 2005.

KOSTOVA, I. et al. Two new sulfated furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, Leipzig, v. 57, n. 1/2, p. 33-38, Jan./Feb. 2002.

KUMAR, A. Comparative and quantitative determination of quercetin and other flavonoids in north indian populations of *Tribulus terrestris* Linn by HPLC. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, Utha, v. 3, n. 4, p. 69-79, 2012.

KUMAR, A.; BHARDWAJ, A. Comparative, qualitative and quantitative chemotypic characterization among North Indian *Tribulus terrestris*. **International Research Journal of Pharmacy**, Rampur, v. 3, n. 6, p. 212-218, 2012.

LEMOS JÚNIOR, H. P.; LEMOS, A. L. A.; LEMOS, L. M. D. *Tribulus terrestris*. **Diagnóstico & Tratamento**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 170-173, 2011.

LI, T. et al. An improved facile method for extraction and determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by focused microwave assisted extraction coupled with GC-MS. **Journal of Separation Science**, New York, v. 32, n. 23/24, p. 4167-4175, Dec. 2009.

LIU, Y. et al. Steroidal glycosides from the fruits of *Tribulus terrestris*. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 50, n. 3, p. 483-488, 2014.

MILAŠIUS, K. et al. Efficacy of the *Tribulus* food supplement used by athletes. **Acta Medica Lituanica**, Warszawa, v. 17, n. 1/2, p. 65-70, Nov. 2010.

MOHAMMED, A. A. et al. Study the biological activities of *Tribulus terrestris* extracts. **Journal of Biotechnology Research Center**, Al-Nahrain, v. 4, n. 1, p. 55-60, 2010.

NEYCHEV, V. K.; MITEV, V. I. The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 101, n. 1/3, p. 319-323, 2005.

NIKAM, T. D.; EBRAHIMI, M. A.; PATIL, V. A. Embryogenic callus culture of *Tribulus terrestris* L. a potential source of harmaline, harmine and diosgenin. **Plant Biotechnology Reports**, London, v. 3, n. 3, p. 243-250, June 2009.

PATIL, N. B. et al. Spectroscopic determination of total phenolic and flavonoid contents of *Tribulus terrestris* fruits. **International Journal of ChemTech Research**, Mumbai, v. 4, n. 3, p. 899-902, July/Sept. 2012.

PHILLIPS, O. A.; MATHEW, K. T.; ORIOWO, M. A. Antihypertensive and vasodilator effects of methanolic and aqueous extracts of *Tribulus terrestris* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 104, n. 3, p. 351-355, 2006.

POKRYWKA, A. et al. Insights into supplements with *Tribulus terrestris* used by athletes. **Journal of Human Kinetics**, Katowice, v. 41, n. 1, p. 99-105, 2014.

ROGERSON, S. et al. The effect of five weeks of *Tribulus terrestris* supplementation on muscle strength and body composition during preseason training in elite rugby league players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, Denver, v. 21, n. 2, p. 348-353, May 2007.

SAHIN, A.; DURU, M. Effects of *Tribulus terrestris* (Puncture Vine) supplementation on performance and digestive system of broiler chicks. **Journal of Agricultural Sciences**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 271-277, Feb. 2010.

SAMY, M. N. et al. Pharmacognostical studies on flower of *Tribulus terrestris* L. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, New Delhi, v. 1, n. 5, p. 18-22, 2013.

SANTOS, C. A. et al. *Tribulus terrestris* versus placebo in the treatment of erectile dysfunction: a prospective, randomized, double blind study. **Actas Urologicas Espanolas**, Barcelona, v. 38, n. 4, p. 244-248, 2014.

SHARIFI, A. M.; DARABI, R.; AKBARLOO, N. Study of antihypertensive mechanism of *Tribulus terrestris* in 2K1C hypertensive rats: role of tissue ACE activity. **Life Sciences**, Varsóvia, v. 73, n. 23, p. 2963-2971, 2003.

SINGH, S.; GUPTA, Y. K. Aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in experimental models in rats. **Journal of Men's Health**, New Rochelle, v. 8, p. S75-S77, 2011. Supplement.

SISTO, M. et al. Saponins from *Tribulus terrestris* L. protect human keratinocytes from UVB induced damage. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausanne, v. 117, n. 1, p. 193-201, Dec. 2012.

TUNCER, M. A. et al. Influence of *Tribulus terrestris* extract on lipid profile and endothelial structure in developing atherosclerotic lesions in the aorta of rabbits on a high-cholesterol diet. **Acta Histochemica**, Jena, v. 111, n. 6, p. 488-500, 2009.

TURAN, F.; CEK, S. Masculinization of african catfish (*Clarias gariepinus*) treated with gokshura (*Tribulus terrestris*). **The Israeli Journal of Aquaculture**, Bamidgeh, v. 59, n. 4, p. 224-229, 2007.

VENTUROSO, L. R. et al. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

WANG, Z. et al. Effect of *Tribulus terrestris* saponins on behavior and neuroendocrine in chronic mild stress depression rats. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, Beijing, v. 33, n. 2, p. 228-232, 2013.

WU, T. S.; SHI, L. S.; KUO, S. C. Alkaloids and other constituents from *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 50, n. 8, p. 1411-1415, Apr. 1999.

YABESH, J. E. M.; PRABHU, S.; VIJAYAKUMAR, S. An ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in silent valley of Kerala, India. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 154, n. 3, p. 774-789, 2014.

YAN, W. et al. Steroidal saponins from fruits of *Tribulus terrestris*. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 45, n. 4, p. 811-817, 1997.

YAN, W. et al. Steroidal saponins from the fruits of *Tribulus terrestris*. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 42, n. 5, p. 1417-1422, July 1996.

YEKTA, M. M. et al. Flavonoid glycosides from *Tribulus terrestris* L. *orientalis*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Shiraz, v. 4, n. 3, p. 231-236, 2008.

ZHANG, J. D. et al. Antifungal activities and action mechanisms of compounds from *Tribulus terrestris* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 103, n. 1, p. 76-84, 2006.

ZHANG, J. D. et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 28, n. 12, p. 2211-2215, 2005.

ZHELEVA-DIMITROVA, D.; OBRESHKOVA, D.; NEDIALKOV, P. Antioxidant activity of *Tribulus terrestris*: a natural product in infertility therapy. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Madhya Pradesh, v. 4, n. 4, p. 508-511, 2012.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1 Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* L.

Este artigo foi redigido de acordo com as normas para submissão na *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*

ARTIGO 1 Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* L.

OLIVEIRA, N.N.P.M.¹; FÉLIX, M.A.R.²; PEREIRA, T.C.S.²; ANDRADE, E.F.²; SILVA, L.M.²; PINTO, J.E.B.P.¹; BERTOLUCCI, S.K.V.¹; SOUSA, R.V.²

¹ Departamento de Agricultura e ² Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras, 37200-000, Lavras, Brasil
nelmaneylanne@posgrad.ufla.br

RESUMO: *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) tem sido tradicionalmente utilizado como afrodisíaco e para melhorar o desempenho atlético. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* L. Foram realizadas extrações por maceração dinâmica, a partir de frutos secos pulverizados de *Tribulus terrestris* para a obtenção do extrato etanólico. Esse extrato foi fracionado por partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. Vinte ratos machos foram distribuídos em 4 grupos (n=5). O grupo controle recebeu água destilada, enquanto os grupos restantes receberam diariamente extrato etanólico, frações hexânica ou aquosa solúvel em metanol na dose única de 42mg/kg/dia durante 70 dias. Ao final do experimento, após os animais serem anestesiados e eutanasiados, amostras de sangue e rins, fígado, baço e tecido adiposo epididimário foram coletados para análises posteriores. As carcaças foram limpas e pesadas para avaliação da composição centesimal corporal. *Tribulus terrestris* L. aumentou o percentual de proteína bruta da carcaça sem proporcionar ganho de peso corporal. No entanto, os percentuais de água, gordura e cinzas não foram alterados, assim como os parâmetros biométricos, bioquímicos sanguíneos e histopatológicos. Portanto, *Tribulus*

terrestris L. aumenta o percentual de proteína bruta na carcaça de ratos Wistar machos.

Palavras-chave: Extratos vegetais, Anabolismo, Composição corporal, Proteína bruta.

ABSTRACT: Biochemical parameters of male Wistar rats supplemented with extract and fruits fractions of *Tribulus terrestris* L. The *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) has been traditionally used as aphrodisiac and to improve the athletic performance. The purpose of this study was to assess biochemical parameters of male Wistar rats supplemented with extracts and fruits fractions of *Tribulus terrestris* L. The ethanolic extract was obtained by means of dynamic maceration of sprayed dried fruit. This extract was fractionated by liquid-liquid partition, using increasing polarity solvents. Twenty male rats were separated in four groups, 5 rats each. The control was supplemented with distilled water, while the others were daily given the ethanolic extract, hexanic or aqueous fraction soluble in methanol in a single dose of 42 mg.kg⁻¹.day⁻¹ for 70 days. In the end of the experiment, animals were anaesthetized and euthanized. Then, samples of blood and kidneys, liver, spleen and epididymal adipose tissue, were collected for further analyses. Carcasses were clean and weighed to assess corporeal centesimal composition. *Tribulus terrestris* increased the percentage of crude protein in the carcass, without resulting in weight gain. However, percentages of water, fatness and ash were not changed, as well as the biometric, blood biochemical and histopathological parameters. Therefore, *Tribulus terrestris* L. increases the percentage of crude protein in the carcass of male Wistar rats.

Keywords: Vegetal extract. Anabolism. Corporeal composition. Crude protein.

Introdução

Os extratos vegetais têm se tornado cada vez mais atrativos devido a suas propriedades farmacológicas para a saúde humana. Eles contêm compostos químicos com atividades biológicas e esses componentes podem servir como suplementos dietéticos melhorando o condicionamento físico e desempenho atlético (FÁTIMA et al., 2008; NOLDIN; CECHINEL FILHO, 2003).

O *Tribulus terrestris* L., popularmente conhecido por vários nomes como tribulus, abrolhos, viagra natural, videira da punctura, espinho de três pontas, espinho do diabo, videira amarela, cabeça de touro, é uma planta da família Zygophyllaceae sendo originária da Índia, mas atualmente está amplamente distribuída em regiões quentes em todo o mundo (BALASUBRAMANI et al., 2010; KOSTOVA; DINCHEV, 2005). O fruto dessa planta apresenta propriedade afrodisíaca (GAUTHAMAN; ADAIKAN; PRASAD, 2002; GAUTHAMAN; GANESAN, 2008; SINGH; GUPTA, 2011) e melhora o desempenho atlético (ROGERSON et al., 2007). Estudos fitoquímicos mostraram a presença de vários compostos nos extratos etanólico, hexânico e metanólico de *Tribulus terrestris* destacando-se as saponinas esteroidais, os alcaloides e os flavonoides (BEDIR; KHAN, 2000; SU et al., 2009).

A partir dos anos 80, graças a suas atraentes propriedades farmacológicas, iniciou o interesse dos países ocidentais pela planta, principalmente por atletas como uma alternativa frente à proibição ao uso de esteroides anabolizantes (POKRYWKA et al., 2014). Milasius et al. (2010) apontaram que *Tribulus terrestris* aumenta a síntese proteica e de massa muscular além de contribuir para a recuperação física pós treino. Andrade et al. (2010) encontraram efeitos positivos na produção espermática de ratos com a administração de três doses 11, 42 e 110mg/kg/dia de um fitoterápico à base de

Tribulus terrestris. No entanto, alguns estudos contradizem esses efeitos, mostrando não haver efeitos quando administrados extratos vegetais ou preparações fitoterápicas obtidas a partir dessa espécie. Neychev e Mitev (2005) afirmaram que um fitoterápico à base de *Tribulus terrestris* não é capaz de aumentar os níveis de hormônios androgênicos em humanos jovens.

Assim, é possível que as razões que levem alguns autores a não obterem êxito com a administração de *Tribulus terrestris* seja devido a limitações dos estudos como um reduzido tamanho amostral ou a ausência de padronização da droga vegetal, pois nas preparações fitoterápicas à base desta planta tem se percebido a utilização de todas as partes da espécie (SANTOS et al., 2014). Com isso, objetivou-se avaliar os parâmetros bioquímicos de ratos Wistar machos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* L.

Material e métodos

Obtenção do fruto e preparo do extrato e frações

Frutos secos de *Tribulus terrestris* L. foram adquiridos da Indústria Farmacêutica Catedral, Vespasiano, Minas Gerais, Brasil. O extrato e frações foram obtidos no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA. O fruto (2.922 g) foi pulverizado em moinho de facas Marconi®, modelo MA-680. O extrato foi preparado por maceração dinâmica, em frascos âmbar de boca larga, mantidos sob agitação constante em agitador orbital Gio Gyrotory® a 164 rpm. O material vegetal pulverizado foi fracionado em porções de cerca de 250 g e extraídos com 500 mL de etanol comercial 92° INPM. Para o esgotamento da droga vegetal foram realizados 10 ciclos de extração, em que a cada 7 dias de maceração, o extrato foi filtrado e o material vegetal remacerado com solvente renovado. As soluções obtidas foram reunidas e o extrato foi seco

em evaporador rotatório sob pressão reduzida a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e, em seguida, mantido em dessecador sob vácuo até secura. O extrato Etanólico Bruto (EB, 219,45 g) foi armazenado em freezer a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ até os ensaios biológicos.

Uma alíquota de 164,59 g do extrato EB foi tomada para procedimentos de partição líquido-líquido. O EB foi ressuscitado em água destilada em dois funis de separação (cerca de 900 mL em cada funil) e particionado sequencialmente com porções (cerca de 3×300 mL) de *n*-hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc) e *n*-butanol (BuOH). Metanol (MeOH) foi adicionado à fração aquosa (AQ), sendo separada a fração aquosa solúvel em metanol (AQsol) daquela insolúvel (AQinsol). Cada fração foi seca em evaporador rotatório sob pressão reduzida a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e, em seguida, mantida em dessecador sob vácuo até secura. A fração AQinsol foi submetida à secagem por liofilização (*Integrated SpeedVac System*, modelo L 101, marca Liobras). Todas as frações foram armazenadas em freezer a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ até os ensaios biológicos. Os rendimentos extrativos das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila, *n*-butanólica, aquosa solúvel em metanol e aquosa insolúvel em metanol foram de 52,29 %, 7,51 %, 6,18 %, 1,65 %, 30,84 % e 1,52%, respectivamente. Os resíduos secos foram de 86,06 g para a fração hexânica, 12,37 g para a fração diclorometânica, 10,17 g para a fração acetato de etila, 2,73 g para a fração *n*-butanólica, 50,76 g para a fração aquosa solúvel em metanol e 2,51 g para a fração aquosa insolúvel em metanol. Na Figura 1 consta o fluxograma que representa o fracionamento realizado.

Animais utilizados

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras sob o protocolo nº 027/14.

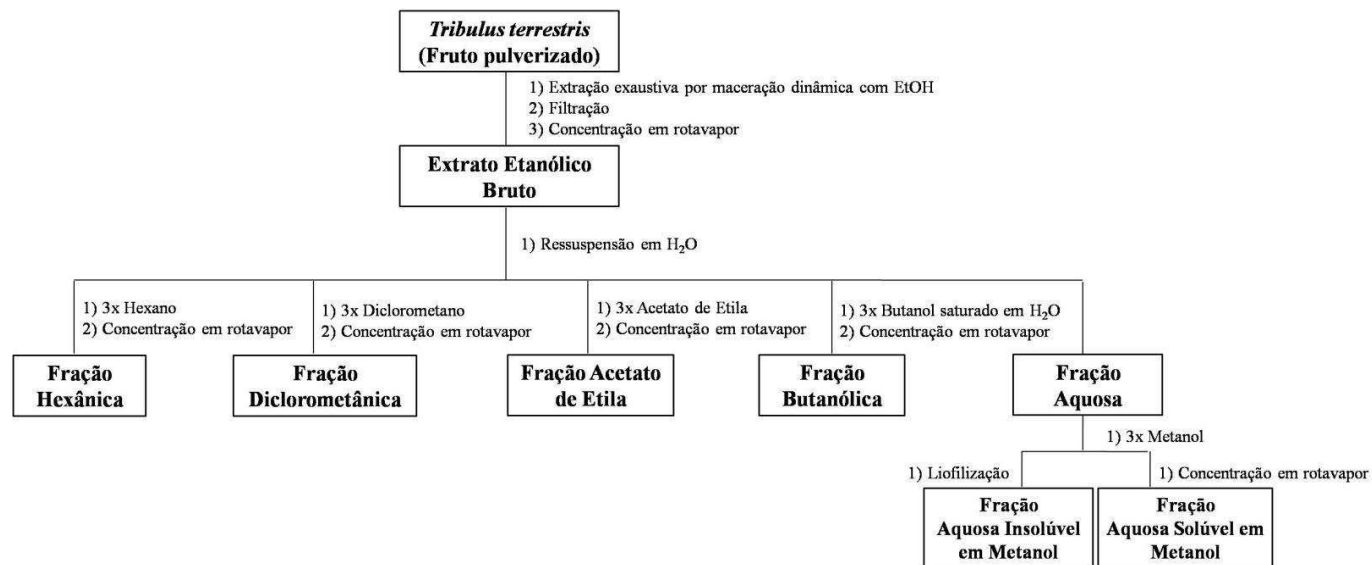


Figura 1. Fluxograma da obtenção do extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* L. a partir de partições líquido-líquido.

Foram utilizados 20 ratos *Rattus norvegicus* (n=5/grupo), machos da linhagem Wistar, com idade aproximada de 60 dias e peso inicial de 295 ± 28 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas e, inicialmente, permaneceram em um período de setes dias de aclimação. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada a $\pm 23^{\circ}\text{C}$ e luminosidade em ciclo 12 h/12 h. Os animais receberam ração comercial para roedores e água *ad libitum*.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais contendo cinco animais em cada grupo: um grupo controle (G₁) tratado com água destilada e os demais grupos (G₂, G₃ e G₄) receberam, respectivamente, a dose única de 42mg/kg/dia do extrato etanólico ou das frações hexânica e aquosa solúvel em metanol. A escolha de tais frações ocorreu por serem de diferentes polaridades. As frações diclorometânica, acetato de etila, *n*-butanólica e aquosa insolúvel em metanol não foram utilizadas nesse estudo. A dose única administrada foi estabelecida de acordo com os estudos de Andrade et al. (2010). Para a administração do extrato e fração aquosa solúvel em metanol foram diluídas em água destilada e a fração hexânica em óleo mineral.

Todos os animais foram submetidos à gavagem diária por 70 dias sendo pesados a cada sete dias e mensurados diariamente o consumo alimentar e de água. No final do período experimental e após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com tiopental sódico (80mg/kg) e eutanasiados por exsanguinação após punção cardíaca.

Parâmetros bioquímicos

Foram coletadas amostras de sangue com seringa contendo anticoagulante EDTA e o plasma foi armazenado em freezer a -20°C até as análises das concentrações plasmáticas de glicose, colesterol total, colesterol em HDL, triacilgliceróis (TAG) e atividade da gama-glutamilttransferase (gama GT) por meio de kits específicos colorimétricos (Gold Analisa Diagnósticos®, Belo Horizonte, Brasil). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os níveis de colesterol em LDL e em VLDL de cada animal foram obtidos através da seguinte equação: $\text{LDL-c} + \text{VLDL-c} = \text{colesterol total} - \text{HDL-c}$ (SEKI; MATSUO; SEKI, 2007).

Coleta dos órgãos

Os animais foram submetidos à abertura ampla da cavidade abdominal até a exposição dos órgãos internos. Foram então coletados e pesados o fígado, rins, baço e tecido adiposo epididimário. O peso dos órgãos e da carcaça foram obtidos individualmente e, em seguida, calculou-se o peso relativo de cada órgão em relação ao peso da carcaça limpa (ANDRADE et al., 2015).

Composição centesimal da carcaça

Após eutanásia e retirada dos órgãos internos, foram removidos a pele, cabeça, pés, mãos e cauda, e as carcaças limpas foram pesadas e armazenadas em freezer a -20°C . Posteriormente, foi realizada a determinação do percentual de água, proteínas, gorduras e cinzas na carcaça dos animais baseado nas metodologias da Association of Official Analytical Chemists - AOAC (2000). Para mensuração do percentual de água, inicialmente, as carcaças foram secas em estufa a 65°C durante 96 horas até obtenção do peso constante. Em seguida, as amostras foram secas em estufa a 105°C durante 24 horas. O percentual de

gordura foi avaliado por extração com éter etílico utilizando o equipamento Soxhlet. Já o percentual de proteínas da carcaça foi obtido utilizando o método Kjeldahl. O resíduo mineral (cinzas) foi determinado pela calcinação das amostras na mufla a 550°C.

Análise histopatológica

O fígado e o rim esquerdo foram removidos, hemisseccionados e imediatamente fixados em formaldeído a 10% tamponado. Posteriormente, os tecidos foram processados rotineiramente e cortes seriados de 5 µm de espessura foram utilizados para confecção de lâminas histológicas que foram coradas com hematoxilina-eosina (LUNA, 1968). As lâminas foram analisadas e fotografadas na magnitude 100x utilizando-se um sistema de captura e análise de imagens, constituído por microscópio binocular Olympus CX31 (Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) com câmera acoplada (SC30 CMOS Color Camera for Light Microscopy, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) após os testes de *Shapiro-Wilk* e de *Bartlett* serem aplicados para verificar a normalidade e homocedasticidade das variâncias. Os tratamentos foram comparados em relação ao controle pelo teste *Dunnett*.

Para as variáveis que não obedeceram aos pressupostos básicos da análise de variância (ganho médio diário de peso e colesterol total) foi utilizado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

O nível de significância adotado durante as análises foi de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do *software* R e do pacote *Multicomp* para realização do teste *Dunnett*.

Resultados

A administração do extrato etanólico e frações hexânica e aquosa solúvel em metanol de *Tribulus terrestris* não afetou o ganho de peso médio diário corporal, nem o consumo médio diário de ração ou de água (Tabela 1).

Animais suplementados com o extrato etanólico e frações hexânica e aquosa solúvel em metanol apresentaram ($p < 0,05$) maior percentual de proteína na carcaça, embora não tenha havido diferenças no percentual de água, gordura e cinzas (Tabela 2).

Não houve diferenças em relação aos parâmetros bioquímicos sanguíneos: glicose, triacilgliceróis, colesterol total, colesterol em HDL, colesterol em LDL mais VLDL e atividade de gama-glutamyltransferase (Tabela 3).

A análise dos pesos relativos do fígado, rins direito e esquerdo, tecido adiposo epididimário direito e esquerdo e baço não apresentaram diferenças em relação ao grupo controle (Tabela 4).

Em relação às análises histopatológicas do fígado (Figura 2) e rim (Figura 3), não houve identificação de lesões nos grupos estudados, ou seja, foram visualizados cortes hepáticos e renais com preservação da arquitetura tecidual.

Discussão

No presente estudo, demonstrou-se que a administração do extrato etanólico e frações hexânica e aquosa solúvel em metanol do fruto de *Tribulus terrestris* L. durante 70 dias aumenta a deposição proteica na carcaça de ratos Wistar machos, corroborando com os relatos na literatura de que *Tribulus terrestris* proporciona efeitos anabólicos (POKRYWKA et al., 2014; ROGERSON et al., 2007). O anabolismo é definido como o estado no qual o nitrogênio é fixado na massa corporal magra, ou por meio do aumento da síntese proteica e/ou redução da degradação proteica em qualquer parte do corpo (EVANS, 2004; KUHN, 2002). Assim, os efeitos anabólicos causam um balanço nitrogenado positivo (FORTUNATO; ROSENTHAL; CARVALHO, 2007).

Diversos estudos corroboram com os resultados do presente estudo sobre a avaliação da composição centesimal da carcaça em que *Tribulus terrestris* não altera o peso corporal, aumenta o percentual de proteína e não altera o percentual de gordura corporal (ANTONIO et al., 2000; MILAŠIUS et al., 2010). O efeito anabólico é manifestado primariamente no músculo, resultando em aumento da massa muscular e controle da gordura corporal não havendo necessariamente mudanças no peso corporal (KAM; YARROW, 2005).

Antonio et al. (2000) avaliaram os efeitos de *Tribulus terrestris* sobre a composição corporal de homens de 18 a 35 anos. Os grupos foram divididos em controle (placebo) e tratamento que recebeu a dose de 3,21 mg/kg de *Tribulus terrestris* durante 8 semanas. Os autores também não encontraram diferenças no peso corporal nem em relação ao percentual de gordura corporal dos grupos suplementados e grupo controle.

Milašius et al. (2010) estudaram os efeitos de *Tribulus terrestris* em atletas e avaliaram o ganho de peso e composição corporal durante um tratamento de 20 dias. Eles também não encontraram diferenças no peso

corporal do grupo tratado em relação ao grupo controle. Entretanto, houve uma tendência de crescimento da massa muscular do grupo experimental.

A enzima gama-glutamyltransferase (GGT) permite o catabolismo da glutathione através da hidrólise de gama-glutamyl proveniente da união entre o glutamato e a cisteína. Esta enzima é largamente encontrada na superfície externa da maioria das células e sua dosagem tem sido ferramenta essencial para o diagnóstico de lesões hepáticas (FENTIMAN; ALLEN, 2010). Além disso, há evidências de que a GGT está alterada em outras patologias graves tais como doenças cardiovasculares e diabetes. Devido a esta importância, este trabalho avaliou a atividade desta enzima em animais suplementados com *Tribulus terrestris* e não encontrou diferenças entre os grupos estudados.

Neste trabalho, a dose de 42mg/kg/dia por 70 dias do extrato e frações da planta não foi capaz de alterar os níveis plasmáticos de glicose em ratos Wistar machos. No entanto, a administração das doses de 200, 400 e 600mg/kg de *Tribulus terrestris* em tilápias (*Oreochromis niloticus*) aumentou os níveis séricos desse composto de maneira proporcional ao aumento da dose (GULTEPE et al., 2014). Enquanto, Li et al. (2002) apontaram que *Tribulus terrestris* diminuiu os níveis séricos de glicose, o que foi atribuído à propriedade hipoglicemiante das saponinas presentes em grandes quantidades nessa planta.

Com relação aos demais parâmetros bioquímicos sanguíneos, a não ocorrência de alterações nos níveis de colesterol presente nas lipoproteínas corroborou com os resultados de outros estudos (GULTEPE et al., 2014). Em atletas suplementados com *Tribulus terrestris* e submetidos a treinamento físico durante 20 dias, também não houve diferenças nos níveis séricos de colesterol total e triacilgliceróis (MILAŠIUS et al., 2010).

No entanto, Tuncer et al. (2009) avaliaram o perfil lipídico de coelhos submetidos à dieta hipercolesterolêmica e suplementados com *Tribulus terrestris*. A planta foi capaz de melhorar o perfil lipídico dos coelhos,

aumentando os níveis de colesterol em HDL e reduzindo os níveis de colesterol em LDL e triacilgliceróis.

A determinação do peso relativo dos órgãos de metabolização/excreção (fígado e rins) pode fornecer indicações da função de cada órgão e atuação da substância testada sobre o organismo. O fígado é considerado o órgão mais relevante em estudos que avaliam parâmetros metabólicos, pois centraliza o metabolismo geral, alterando seu peso e as atividades metabólicas (COLES, 1974). No entanto, o peso relativo do fígado não foi alterado pela administração do extrato e frações de *Tribulus terrestris*. Adicionalmente, não foram encontradas alterações nas análises histopatológicas deste tecido nem do tecido renal.

Conclusões

A administração diária por 70 dias de 42mg/kg do extrato e frações de *Tribulus terrestris* sugere melhora nos parâmetros bioquímicos, no que diz respeito ao acúmulo de proteína na carcaça de ratos Wistar machos. Esse efeito é observado sem proporcionar ganho de peso e alterações no perfil lipídico, nos níveis de glicose e na atividade de GGT. Além disso, não há alterações histopatológicas dos órgãos de metabolização/excreção. No entanto, outros estudos, com diferentes doses por períodos mais prolongados e avaliação da genotoxicidade e carcinogenicidade devem ser realizados para complementar esta etapa de avaliação pré-clínica.

Agradecimentos

Os autores agradecem à FAPEMIG, à CAPES e ao CNPq pelos auxílios financeiros.

Tabela 1 Ganho médio diário de peso (g), consumo médio diário de ração (g) e consumo médio diário de água (mL) de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* durante 70 dias (média \pm desvio padrão) (n=20)

Parâmetros	Grupos experimentais			
	Controle	Extrato etanólico	Fração hexânica	Fração aquosa solúvel em metanol
Ganho Diário de Peso (g)	1,34 \pm 0,67	0,82 \pm 0,38	1,12 \pm 0,56	1,68 \pm 0,43
Consumo Diário de Ração (g)	23,74 \pm 2,17	24,17 \pm 3,18	25,16 \pm 2,19	26,73 \pm 2,92
Consumo Diário de Água (mL)	27,88 \pm 2,36	26,35 \pm 4,38	31,22 \pm 4,25	29,68 \pm 4,49

Tabela 2 Composição centesimal da carcaça de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* (média \pm desvio padrão) (n=20)

Parâmetros	Grupos experimentais			
	Controle	Extrato etanólico	Fração hexânica	Fração aquosa solúvel em metanol
% Água	70,13 \pm 0,64	68,53 \pm 1,10	69,18 \pm 0,86	69,71 \pm 0,98
% Proteína	15,35 \pm 1,07	17,06 \pm 3,58*	19,69 \pm 0,37*	19,11 \pm 0,98*
% Gordura	5,94 \pm 0,39	6,71 \pm 1,45	6,14 \pm 0,90	7,08 \pm 0,97
% Cinzas	4,00 \pm 0,53	4,33 \pm 0,40	4,05 \pm 0,26	3,87 \pm 0,35

* Diferem do controle pelo teste *Dunnnett* (p<0,05);

Tabela 3 Análises bioquímicas sanguíneas de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* (média \pm desvio padrão) (n=20)

Parâmetros	Grupos experimentais				VR
	Controle	Extrato etanólico	Fração hexânica	Fração aquosa solúvel em metanol	
Glicose (mg/dL)	136,02 \pm 9,58	125,53 \pm 4,20	134,91 \pm 12,95	139,08 \pm 11,38	120 - 135 ⁽¹⁾
Colesterol total (mg/dL)	104,57 \pm 6,68	102,91 \pm 3,02	106,47 \pm 5,71	103,40 \pm 6,67	95,52 ⁽²⁾
HDL-c (mg/dL)	37,86 \pm 1,83	39,09 \pm 4,09	43,79 \pm 5,80	41,21 \pm 5,99	39,44 ⁽²⁾
LDL-c + VLDL-c (mg/dL)	66,71 \pm 5,86	63,82 \pm 3,04	62,68 \pm 8,34	62,19 \pm 7,94	56,0 ⁽²⁾
TAG (mg/dL)	119,75 \pm 5,71	123,99 \pm 10,59	128,41 \pm 8,48	136,33 \pm 10,35	85-120 ⁽¹⁾
Gama GT (U/L)	2,98 \pm 1,75	2,47 \pm 0,92	2,64 \pm 1,42	3,32 \pm 0,35	1,73-5,21 ⁽³⁾

VR: Valores de referência; ⁽¹⁾ Andrade et al. (2014); ⁽²⁾ Lisenko et al. (2014); ⁽³⁾ Lima et al. (2014); TAG: Triacilgliceróis; Gama GT: Gama glutamiltransferase.

Tabela 4 Peso relativo de órgãos de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* (média \pm desvio padrão) (n=20)

Parâmetros	Grupos experimentais			
	Controle	Extrato etanólico	Fração hexânica	Fração aquosa solúvel em metanol
Fígado (%)	4,61 \pm 0,27	4,69 \pm 0,38	4,60 \pm 0,18	4,78 \pm 0,52
Rim Direito (%)	0,61 \pm 0,05	0,64 \pm 0,05	0,62 \pm 0,04	0,59 \pm 0,08
Rim Esquerdo (%)	0,57 \pm 0,04	0,62 \pm 0,08	0,58 \pm 0,04	0,62 \pm 0,09
Tecido Adiposo Epididimário Direito (%)	1,27 \pm 0,29	0,79 \pm 0,51	1,15 \pm 0,36	1,22 \pm 0,33
Tecido Adiposo Epididimário Esquerdo (%)	1,61 \pm 0,21	0,73 \pm 0,38	1,07 \pm 0,28	1,23 \pm 0,37
Baço (%)	0,31 \pm 0,03	0,35 \pm 0,05	0,32 \pm 0,03	0,35 \pm 0,05

(Versão preliminar)

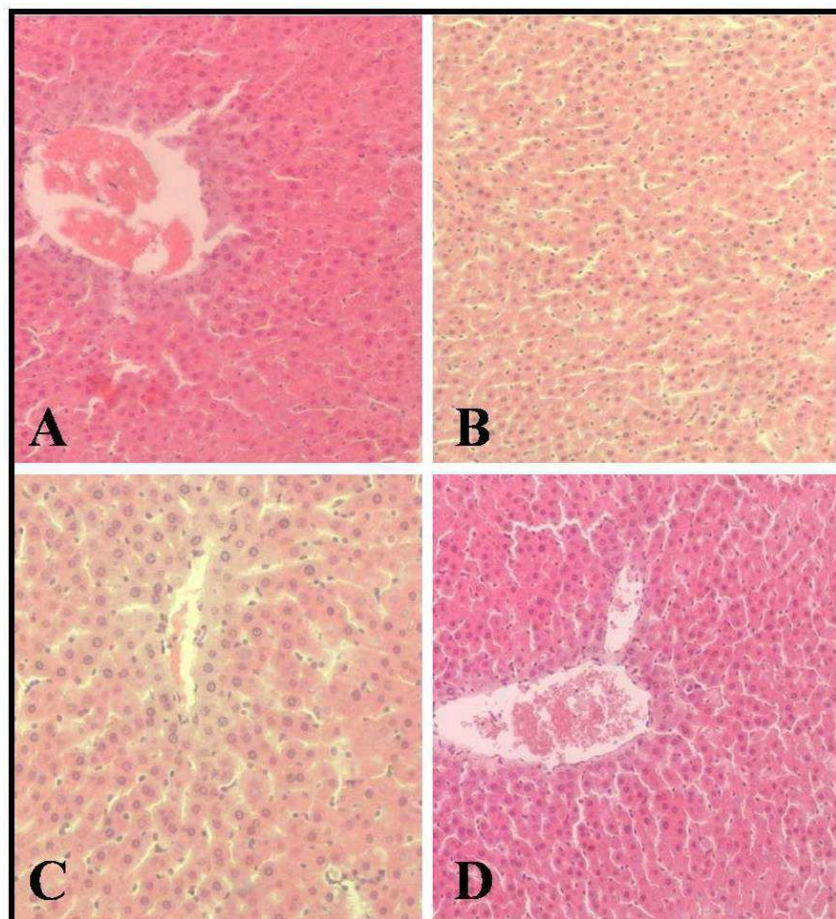


Figura 2 Corte histológico do fígado de animais suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* durante 70 dias. (HE, Aumento de 100x) (A-Controle; B-Extrato etanólico; C-Fração hexânica; D-Fração aquosa solúvel em metanol)

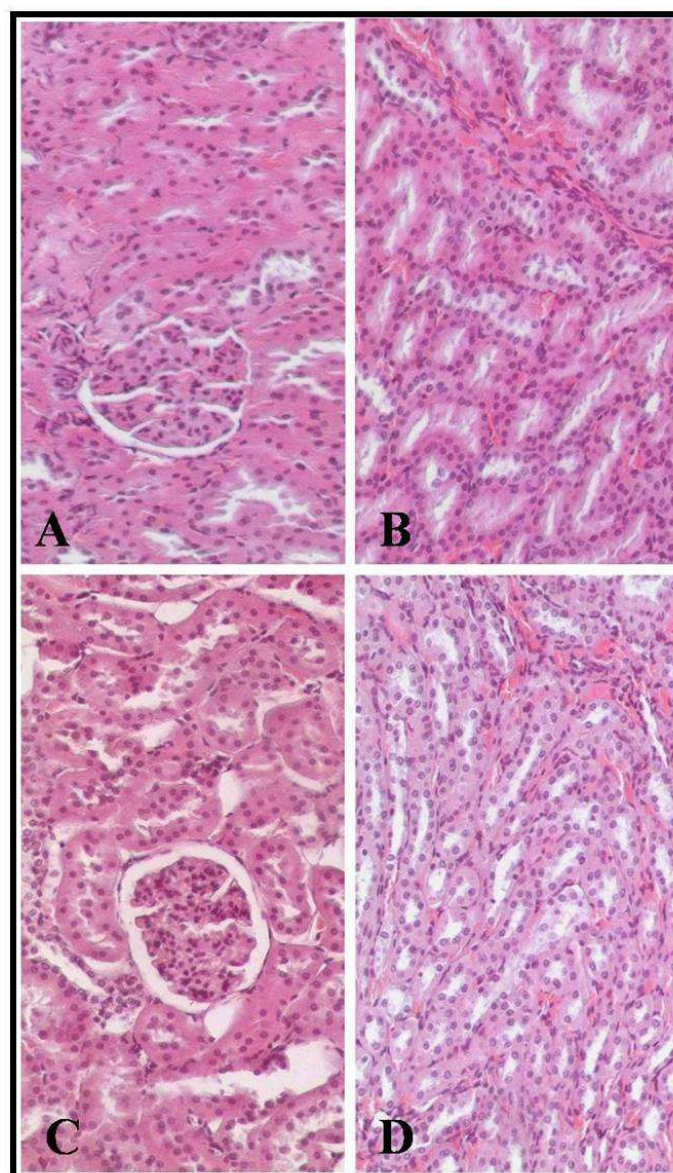


Figura 3 Corte histológico do rim esquerdo de animais suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* durante 70 dias. (HE, Aumento de 100x) (**Controle:** A - Região cortical; B - Região medular; **Fração hexânica:** C - Região cortical; D - Região medular)

REFERÊNCIAS

ANDRADE, A. J. M. et al. Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 127, n. 1, p. 165-170, 2010.

ANDRADE, E. F. et al. Adaptation to physical training in rats orally supplemented with glycerol. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 93, n. 1, p. 1-7, Jan. 2015.

ANDRADE, E. F. et al. Metabolic effects of glycerol supplementation and aerobic physical training on Wistar rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 92, n. 9, p. 1-8, July 2014.

ANTONIO, J. et al. The effects of *Tribulus terrestris* on body composition and exercise performance in resistance-trained males. **International Journal Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, Champaign, v. 10, n. 2, p. 208-215, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY. **Official methods of analysis**. Washington, 2000. 49 p.

BALASUBRAMANI, S. P. et al. Development of ITS sequence based molecular marker to distinguish *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) from its adulterants. **Fitoterapia**, Milano, v. 81, n. 6, p. 503-508, 2010.

BEDIR, E.; KHAN, I. A. New steroidal glycosides from the fruits of *Tribulus terrestris*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, n. 12, p. 1699-1701, 2000.

COLES, E. H. Liver function. In: _____. **Veterinary clinical pathology**. 2nd ed. Philadelphia: Saunders, 1974. p. 203-214.

EVANS, N. A. Current concepts in anabolic-androgenic steroids. **The American Journal of Sports Medicine**, Thousand Oaks, v. 32, n. 3, p. 534-542, 2004.

FÁTIMA, A. de et al. Wound healing agents: the role of natural and non-natural products in drug development. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, Beijing, v. 8, n. 9, p. 879-888, 2008.

FENTIMAN, I. S.; ALLEN, D. S. γ -Glutamyl transferase and breast cancer risk. **British Journal of Cancer**, Edinburgh, v. 103, n. 1, p. 90-93, 2010.

FORTUNATO, R. S.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. Abuso de esteroides anabolizantes e seu impacto sobre a função tireoidea. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabolismo**, São Paulo, v. 51, n. 9, p. 1417-1424, out. 2007.

GAUTHAMAN, K.; ADAIKAN, P. G.; PRASAD, R. N. V. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. **Life Sciences**, Elmsford, v. 71, n. 12, p. 1385-1396, 2002.

GAUTHAMAN, K.; GANESAN, A. P. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction: an evaluation using primates, rabbit and rat. **Phytomedicine**, Jena, v. 15, n. 1/2, p. 44-54, Jan. 2008.

GULTEPE, N. et al. Effects of dietary *Tribulus terrestris* extract supplementation on growth, feed utilization, hematological, immunological, and biochemical variables of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **The Israeli Journal of Aquaculture**, Jerusalem, v. 66, n. 1, p. 1-12, Nov. 2014.

KAM, P. C.; YARROW, M. Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations. **Anaesthesia**, Oxford, v. 60, n. 7, p. 685-692, 2005.

KOSTOVA, I.; DINCHEV, D. Saponins in *Tribulus terrestris*: chemistry and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, Berlin, v. 4, n. 2/3, p. 111-137, July 2005.

KUHN, C. M. Anabolic steroids. **Recent Progress in Hormone Research**, San Diego, v. 57, n. 1, p. 411-434, 2002.

LI, M. et al. Hypoglycemic effect of saponin from *Tribulus terrestris*. **Zhong Yao Cai**, Beijing, v. 25, n. 6, p. 420-422, June 2002.

LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, Aracajú, v. 10, n. 3, p. 1-9, mar. 2014.

LISENKO, K. G. et al. Metabolic parameters in rats receiving different levels of oral glycerol supplementation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 99, n. 2, p. 265-272, Apr. 2014.

LUNA, L. G. **Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. New York: McGraw-Hill, 1968. 258 p.

MILAŠIUS, K. et al. Efficacy of the *Tribulus* food supplement used by athletes. **Acta Medica Lituanica**, Warszawa, v. 17, n. 1/2, p. 65-70, Nov. 2010.

NEYCHEV, V. K.; MITEV, V. I. The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 101, n. 1/3, p. 319-323, 2005.

NOLDIN, V. F.; CECHINEL FILHO, V. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (Alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 331-334, 2003.

POKRYWKA, A. et al. Insights into supplements with *Tribulus terrestris* used by athletes. **Journal of Human Kinetics**, Katowice, v. 41, n. 1, p. 99-105, 2014.

ROGERSON, S. et al. The effect of five weeks of *Tribulus terrestris* supplementation on muscle strength and body composition during preseason

training in elite rugby league players. **Journal of Strength and Conditioning Research**, Denver, v. 21, n. 2, p. 348-353, May 2007.

SANTOS, C. A. et al. *Tribulus terrestris* versus placebo in the treatment of erectile dysfunction: a prospective, randomized, double blind study. **Actas Urológicas Espanolas**, Barcelona, v. 38, n. 4, p. 244-248, 2014.

SEKI, M. O.; MATSUO, T.; SEKI, M. Colesterol não-HDL em escolares de 7 a 17 anos de idade em um município brasileiro. **Revista Panamericana de Salud Publica**, Washington, v. 21, n. 5, p. 307-312, 2007.

SINGH, S.; GUPTA, Y. K. Aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in experimental models in rats. **Journal of Men's Health**, New Rochelle, v. 8, p. S75-S77, 2011. Supplement.

SU, L. et al. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. **Steroids**, Stoneham, v. 74, n. 4/5, p. 399-403, 2009.

TUNCER, M. A. et al. Influence of *Tribulus terrestris* extract on lipid profile and endothelial structure in developing atherosclerotic lesions in the aorta of rabbits on a high-cholesterol diet. **Acta Histochemica**, Jena, v. 111, n. 6, p. 488-500, 2009.

ARTIGO 2 Qualidade espermática e histomorfometria dos testículos de ratos Wistar suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* L.

Este artigo foi redigido de acordo com as normas para submissão na revista
Brazilian Archives of Biology and Technology

Qualidade espermática e histomorfometria dos testículos de ratos Wistar suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* L.

[*Sperm quality and testicular histomorphometry of Wistar rats supplemented with extracts and fractions of fruits of Tribulus terrestris L.*]

N.N.P.M. Oliveira^{1*}; M.A.R. Félix²; T.C.S. Pereira²; L.G.P. Rocha²; J.R. Miranda²; M.G. Zangeronimo²; J.E.B.P. Pinto¹; S.K.V. Bertolucci¹; R.V. Sousa²

¹ Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras

² Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras

Caixa Postal 3037 – Campus Universitário

Lavras, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO

Objetivou-se avaliar a qualidade espermática e histomorfometria dos testículos de ratos Wistar suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* L. Foram realizadas extrações por maceração dinâmica, a partir de frutos secos pulverizados de *Tribulus terrestris* para a obtenção do extrato etanólico. Esse extrato foi fracionado por partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. Vinte ratos machos foram distribuídos em 4 grupos (n=5). O grupo controle recebeu água destilada, enquanto os grupos restantes receberam diariamente extrato etanólico ou frações hexânica ou aquosa solúvel em metanol na dose única de 42mg/kg/dia durante 70 dias. Ao final do experimento, após os animais serem anestesiados e eutanasiados, os testículos foram coletados e pesados. Na análise dos parâmetros biométricos, não houve alterações no peso corporal, mas os pesos testiculares médios dos grupos suplementados com extrato etanólico e fração aquosa solúvel em metanol apresentaram-se maiores quando comparados ao grupo controle. O índice gonadossomático aumentou no grupo suplementado com extrato etanólico. Não houve diferença no diâmetro tubular, no entanto, a altura do epitélio tubular e o comprimento total dos túbulos apresentaram-se aumentados nos animais suplementados com o extrato etanólico. O volume tubular aumentou em todos os

grupos experimentais em relação ao controle. O volume nuclear, volume citoplasmático e volume individual das células de Leydig aumentaram nos animais suplementados com as frações hexânica e aquosa solúvel em metanol. Conclui-se que o extrato etanólico de *Tribulus terrestris* L. influencia na espermatogênese pelas alterações evidenciadas no compartimento tubular dos testículos tais como aumento do comprimento tubular total, volume tubular e altura do epitélio tubular; enquanto, as frações hexânica e aquosa solúvel em metanol promovem alterações no compartimento intertubular, pois aumentam o volume nuclear, volume citoplasmático e volume individual das células de Leydig. No entanto, o extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* não melhoram a qualidade espermática de ratos Wistar.

Palavras-chave: Extratos vegetais; Espermatogênese; Células de Leydig.

ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the sperm quality and testicular histomorphometry of Wistar rats supplemented with extracts and fractions of fruits of *Tribulus terrestris* L. The ethanolic extract was obtained by means of dynamic maceration of sprayed dried fruit. This extract was fractionated by liquid-liquid partition, using increasing polarity solvents. Twenty male rats were separated in four groups, 5 rats each. The control was supplemented with distilled water, while the others were daily given the ethanolic extract, hexanic or aqueous fraction soluble in methanol in a single dose of $42 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ for 70 days. In the end of the experiment, animals were anaesthetized and euthanized. Then, samples of testicles were collected and weighed. Regarding the biometric parameters, there was no change in corporeal weight, but the mean testicular weight of groups supplemented with ethanolic extract and aqueous fraction soluble in methanol was found to be greater when compared to the control. The gonadosomatic index increased in the group supplemented with ethanolic extract. There was no difference in tubular diameter, however, the height of tubular epithelium and the total length of tubules were found to be increased in animals supplemented with ethanolic extracts. The tubular volume increased in all groups. The nuclear, cytoplasmic and individual volume of Leydig cells increased in animals supplemented with hexanic and aqueous fractions soluble in methanol. It is concluded that the extract of *Tribulus terrestris* L. influences the spermatogenesis, shown by changes in testicles tubular compartment, such as increase in total tubular length, tubular volume and height of tubular epithelium, while the hexanic and aqueous fractions soluble in methanol promote changes in the intertubular compartment, because they increase the nuclear, cytoplasmic and individual volume of Leydig cells.

Therefore, the extract and fractions of fruits of *Tribulus terrestris* did not improve the sperm quality of Wistar rats.

Keywords: Vegetal extract. Spermatogenesis. Leydig cells.

INTRODUÇÃO

A infertilidade é um problema de proporção mundial, afetando em média de 8 a 12% dos casais. A baixa concentração de espermatozoides é uma das principais causas da infertilidade masculina (SELLANDI; THAKAR; BAGHEL, 2012). O testículo de mamíferos é um órgão suscetível ao uso de substâncias tóxicas que podem afetar a espermatogênese levando a modificações na qualidade do sêmen podendo culminar em alteração da fertilidade (PANNOCCHIA et al., 2008).

O *Tribulus terrestris* L., popularmente conhecido por vários nomes como tribulus, abrolhos, viagra natural, videira da punctura, espinho de três pontas, espinho do diabo, videira amarela, cabeça de touro, é uma planta da família Zygophyllaceae sendo originária da Índia, mas atualmente está amplamente distribuída em regiões quentes em todo o mundo (HAMMODA et al., 2013; KOSTOVA; DINCHEV, 2005). Na medicina tradicional chinesa e indiana, o fruto é utilizado no tratamento da infertilidade, impotência, disfunção erétil e baixa libido (GAUTHAMAN; ADAIKAN; PRASAD, 2002; GAUTHAMAN; GANESAN, 2008; SINGH; GUPTA, 2011).

Estudos fitoquímicos mostraram a presença de vários compostos nos extratos etanólico, hexânico e metanólico de *Tribulus terrestris* destacando-se as saponinas esteroidais, alcaloides e flavonoides (BEDIR; KHAN, 2000; DINCHEV et al., 2008; SU et al., 2009).

Alguns trabalhos avaliaram o efeito da administração de *Tribulus terrestris* sobre o sistema reprodutivo masculino e demonstraram que a planta

pode influenciar positivamente a espermatogênese (ARSYAD, 1996; BASHIR et al., 2009; ELAHI; ASL; SHAHIAN, 2013; KESHTMAND et al., 2014). Além disso, Andrade et al. (2010) encontraram efeitos positivos na produção espermática de ratos Wistar com a administração de três doses 11, 42 e 110mg/kg/dia de um fitoterápico à base de *Tribulus terrestris*. No entanto, alguns estudos contradizem esses efeitos, mostrando não haver efeitos quando administrados extratos vegetais ou preparações fitoterápicas obtidas a partir dessa espécie. Neychev e Mitev (2005) afirmaram que um fitoterápico à base de *Tribulus terrestris* não é capaz de aumentar os níveis de hormônios androgênicos em humanos jovens. Assim, os resultados que envolvem a eficácia dessa espécie ainda são incertos e controversos.

Considerando o seu uso popular e os incipientes estudos na área da reprodução, objetivou-se avaliar a qualidade espermática e histomorfometria dos testículos de ratos Wistar suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do fruto e preparo do extrato e frações

Frutos secos de *Tribulus terrestris* L. foram adquiridos da Indústria Farmacêutica Catedral, Vespasiano, Minas Gerais, Brasil. O extrato e frações foram obtidos no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA. O fruto (2.922 g) foi pulverizado em moinho de facas Marconi®, modelo MA-680. O extrato foi preparado por maceração dinâmica, em frascos âmbar de boca larga, mantidos sob agitação constante em agitador orbital Gio Gyrotory® a 164 rpm. O material vegetal pulverizado foi fracionado em porções de cerca de 250 g e extraídos com 500 mL de etanol comercial 92° INPM. Para o

esgotamento da droga vegetal foram realizados 10 ciclos de extração, em que a cada 7 dias de maceração, o extrato foi filtrado e o material vegetal remacerado com solvente renovado. As soluções obtidas foram reunidas e o extrato foi seco em evaporador rotatório sob pressão reduzida a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e, em seguida, mantido em dessecador sob vácuo até secura. O extrato Etanólico Bruto (EB, 219,45 g) foi armazenado em freezer a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ até os ensaios biológicos.

Uma alíquota de 164,59 g do extrato EB foi tomada para procedimentos de partição líquido-líquido. O EB foi ressuspendido em água destilada em dois funis de separação (cerca de 900 mL em cada funil) e particionado sequencialmente com porções (cerca de 3×300 mL) de *n*-hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (EtOAc) e *n*-butanol (BuOH). Metanol (MeOH) foi adicionado à fração aquosa (AQ), sendo separada a fração aquosa solúvel em metanol (AQsol) daquela insolúvel (AQinsol). Cada fração foi seca em evaporador rotatório sob pressão reduzida a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ e, em seguida, mantida em dessecador sob vácuo até secura. A fração AQinsol foi submetida à secagem por liofilização (*Integrated SpeedVac System*, modelo L 101, marca Liobras). Todas as frações foram armazenadas em freezer a $-18 \pm 2^\circ\text{C}$ até os ensaios biológicos. Os rendimentos extrativos das frações hexânica, diclorometânica, acetato de etila, *n*-butanólica, aquosa solúvel em metanol e aquosa insolúvel em metanol foram de 52,29 %, 7,51 %, 6,18 %, 1,65 %, 30,84 % e 1,52%, respectivamente. Os resíduos secos foram de 86,06 g para a fração hexânica, 12,37 g para a fração diclorometânica, 10,17 g para a fração acetato de etila, 2,73 g para a fração *n*-butanólica, 50,76 g para a fração aquosa solúvel em metanol e 2,51 g para a fração aquosa insolúvel em metanol.

Animais utilizados

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras sob o protocolo nº 027/14.

Foram utilizados 20 ratos *Rattus norvegicus* (n=5/grupo), machos da linhagem Wistar, com idade aproximada de 60 dias e peso inicial de 295 ± 28 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os animais foram colocados individualmente em gaiolas metabólicas e, inicialmente, permaneceram em um período de setes dias de aclimação. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada a $\pm 23^\circ\text{C}$ e luminosidade em ciclo 12 h/12 h. Os animais receberam ração comercial para roedores e água *ad libitum*.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais contendo cinco animais em cada grupo: um grupo controle (G₁) tratado com água destilada e os demais grupos (G₂, G₃ e G₄) receberam, respectivamente, a dose única de 42mg/kg/dia do extrato etanólico ou das frações hexânica e aquosa solúvel em metanol. A escolha de tais frações ocorreu por serem de diferentes polaridades. As frações diclorometânica, acetato de etila, *n*-butanólica e aquosa insolúvel em metanol não foram utilizadas nesse estudo. A dose única administrada foi estabelecida de acordo com os estudos de Andrade et al. (2010). Para a administração do extrato e fração aquosa solúvel em metanol foram diluídas em água destilada e a fração hexânica em óleo mineral.

Os animais foram submetidos à gavagem diária por 70 dias sendo pesados a cada sete dias. No final do período experimental e após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com tiopental sódico (80mg/kg) e eutanasiados por exsanguinação após punção cardíaca. Em seguida, os animais foram submetidos à abertura ampla da cavidade abdominal até a exposição dos órgãos reprodutivos. Foram então coletados e pesados os testículos.

Índice gonadossomático

Baseado nos pesos corporais e testiculares foi calculado o índice gonadossomático (IGS) a partir da fórmula $IGS = (PG/PC)*100$ onde PG = peso total das gônadas e PC = peso corporal (AMANN, 1970).

Análise Morfométrica

Para a análise morfométrica foram coletados os testículos direitos que foram fixados em Bouin (ácido pícrico saturado 75%, formol 25%, ácido acético glacial 5%) por 24 horas e então transferidos para um recipiente com álcool 70%. O material foi desidratado em passagens por soluções de concentrações crescentes de álcool etílico (80%, 90%, 95% e absoluto), diafanizado em xilol e, posteriormente, incluído em parafina. Secções de 5 µm foram utilizadas para confecção de lâminas histológicas que foram coradas com hematoxilina-eosina (LUNA, 1968; PANNOCCIA et al., 2008).

Para esta análise, foram obtidas imagens das lâminas histológicas em um sistema de captura de imagens, constituído por microscópio binocular (CX31, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) e câmera de captura de imagem digital (SC30, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). As fotos obtidas foram analisadas no software ImageJ (NIH). Foram capturadas imagens, a partir da lente objetiva de 10x do tecido de cada animal em 15 campos diferentes.

O diâmetro tubular médio e a altura do epitélio tubular foram obtidos, para cada animal, a partir da medida de 30 secções transversais de túbulos seminíferos de contorno mais circular possível, não levando em consideração o estágio do ciclo do epitélio seminífero (BERNDTSON et al., 1989).

As proporções volumétricas dos diversos constituintes do parênquima testicular, tais como compartimento tubular (lúmen, epitélio e túnica própria) e compartimento intertubular (células de Leydig, seio linfático, vasos sanguíneos e outros) foram avaliadas a partir da contagem de pontos sobre túbulo e intertúbulo sobrepondo-se uma graticula contendo 432 pontos às imagens obtidas, em um total de 15 campos por segmento por animal, escolhidos ao acaso, totalizando 6.480 pontos.

O volume (mL) de cada componente testicular avaliado foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido do testículo.

O comprimento total (metros) dos túbulos seminíferos foi estimado a partir do volume ocupado pelos túbulos seminíferos nos testículos e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal, empregando-se a fórmula onde $CT = VTS / \pi R^2$ (VTS = volume total dos túbulos seminíferos; πR^2 = área da secção transversal dos túbulos seminíferos; R = raio tubular) (ATTAL; COUROT, 1963).

O volume individual das células de Leydig foi obtido a partir do volume do núcleo e da proporção entre núcleo e citoplasma. O volume do núcleo foi obtido utilizando a média do diâmetro nuclear, tendo sido avaliados 20 diâmetros nucleares para cada animal. O volume nuclear individual obtido foi expresso em (μm^3), utilizando-se a fórmula $4/3\pi R^3$, onde R = diâmetro nuclear/2. Para calcular a proporção entre núcleo e citoplasma, foi utilizada graticula com 432 intersecções (pontos), em aumento de 1000x. Aproximadamente mil pontos sobre células de Leydig foram contados para cada animal. O número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo foi estimado a partir do volume individual de células de Leydig e do volume ocupado pelas células de Leydig no testículo.

Análise da qualidade espermática

Obtenção dos espermatozoides

Imediatamente após a eutanásia dos animais, um corte de aproximadamente 2 mm de espessura foi realizado na cauda do epidídimo direito. O fragmento obtido pelo corte foi então incubado em banho-maria em 5 mL de meio TALP (Tyrode's - Albumina - Lactato - Piruvato) a 37 °C por 10 minutos (LOTFI et al., 2013).

Motilidade (% espermatozoides móveis)

Para essa análise, uma gota de 5 µL do sobrenadante do tubo contendo os espermatozoides foi colocada entre lâmina e lamínula e observada na magnitude de 100x em microscopia de contraste de fase negativa (CX31, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). Foi realizada a avaliação do movimento dos espermatozoides em três diferentes campos e a motilidade foi expressa a partir da média dos campos, em valores percentuais de espermatozoides móveis em relação à quantidade de espermatozoides presentes no campo (BADKOOBEH et al., 2013).

Concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL)

Para essa avaliação, 10 µL do sobrenadante dos tubos contendo os espermatozoides oriundos do epidídimo foram diluídos em 990µL de uma solução de paraformaldeído e citrato de sódio. Aproximadamente 10µL do conteúdo diluído foi transferido para um hemocitômetro (Câmara de Newbauer), o qual foi levado em microscopia óptica (CX31, Olympus Optical do Brasil

Ltda, São Paulo, Brasil) na magnitude de 400x, sendo realizada a contagem das células sedimentadas sobre a superfície da câmara. O cálculo da concentração espermática foi realizado de acordo com o número de células contadas e as dimensões do hemocitômetro e a concentração foi expressa em milhões de espermatozoides por mL (BADKOOBEH et al., 2013).

Morfologia (% células normais)

Para análise da morfologia espermática, uma gota de aproximadamente 20 μ L da suspensão espermática foi colocada sobre lâminas microscópicas, sendo realizado um esfregaço deste conteúdo. As lâminas foram secas e então coradas com eosina-nigrosina (1% de eosina-Y e 5% de nigrosina). Após a secagem, as mesmas foram observadas em microscopia óptica (CX31, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) na magnitude de 400x. Foi realizada a contagem diferencial de 200 espermatozoides por lâmina, sendo observadas as alterações de forma de cabeça, peça intermediária e cauda. Os resultados foram expressos em porcentagem de espermatozoides normais (BADKOOBEH et al., 2013).

Integridade de membrana (Viabilidade espermática)

Uma alíquota de 20 μ L da suspensão contendo os espermatozoides foi diluída com igual volume de eosina-nigrosina (1% de eosina-Y e 5% de nigrosina). Foi então realizado um esfregaço do conteúdo sobre lâmina microscópica e após sua secagem, as preparações foram avaliadas em microscopia óptica (CX31, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) em magnitude de 400x. Foi realizada a contagem diferencial de 200 espermatozoides, observando a proporção de espermatozoides não corados

(membrana íntegra, ditos como viáveis) sobre os corados (membrana não íntegra, ditos como não viáveis). Após a contagem, os resultados foram expressos em porcentagem de espermatozoides com a membrana íntegra (viáveis) sobre o total de espermatozoides contados (BADKOOBEH et al., 2013).

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) após os testes de *Shapiro-Wilk* e de *Bartlett* serem aplicados para verificar a normalidade e homocedasticidade das variâncias. Os tratamentos foram comparados em relação ao controle pelo teste *Dunnett*.

Para a variável que não obedeceu aos pressupostos básicos da análise de variância (morfologia) foi utilizado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*.

O nível de significância adotado durante as análises foi de $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do *software* R e do pacote *Multcomp* para realização do teste *Dunnett*.

RESULTADOS

Os resultados desse estudo para a análise dos parâmetros biométricos dos animais mostraram que não houve alterações ($p > 0,05$) no peso corporal dos grupos estudados. No entanto, os pesos testiculares médios do grupos suplementados com extrato etanólico e fração aquosa solúvel em metanol de *Tribulus terrestris* foram maiores ($p < 0,05$) quando comparados ao do grupo controle. O índice gonadossomático dos animais que receberam o extrato etanólico foi maior ($p < 0,05$) que o determinado para o grupo controle (Tabela 1).

Em relação aos parâmetros morfométricos das gônadas, não houve diferenças ($p>0,05$) no diâmetro dos túbulos seminíferos, nem no percentual de túbulos seminíferos por testículo ($p>0,05$). Entretanto, houve maior altura do epitélio tubular ($p<0,05$), bem como maior comprimento tubular total ($p<0,05$) no grupo que recebeu o extrato etanólico. O volume tubular (mL) de todos os grupos experimentais suplementados com o extrato e frações de *Tribulus terrestris* apresentaram maiores valores ($p<0,05$) quando comparados ao grupo controle (Tabela 1).

Na análise das células de Leydig, houve ($p<0,05$) maior volume nuclear, volume citoplasmático e volume individual celular nos grupos suplementados com as frações hexânica e aquosa solúvel em metanol. Entretanto, a fração hexânica diminuiu ($p<0,05$) o número de células de Leydig por grama de testículo (Tabela 1).

Em relação à avaliação da qualidade espermática, a motilidade, o percentual de células normais, a concentração espermática e a integridade estrutural de membranas não sofreram alterações (Tabela 2).

DISCUSSÃO

No presente estudo, foi observado que o extrato etanólico e frações hexânica e aquosa solúvel em metanol do fruto de *Tribulus terrestris* L. promoveram alterações biométricas e morfométricas nas gônadas de ratos Wistar na dose única de 42mg/kg por 70 dias. No entanto, a suplementação com *Tribulus terrestris* não proporcionou alterações na qualidade espermática dos animais.

Os animais suplementados com extrato etanólico e fração aquosa solúvel em metanol do fruto de *Tribulus terrestris* apresentaram aumento no peso testicular. Mudanças nos pesos absolutos e relativos dos órgãos reprodutivos são evidências para classificar inicialmente uma substância com possível potencial

reprodutivo (ZENICK et al., 1994). A ausência de alteração significativa no peso corporal entre os grupos e o aumento do peso testicular é justificada pelo fato de o peso testicular não acompanhar proporcionalmente o peso corporal, uma vez que animais de grande peso corporal produziram um enorme excedente de espermatozoides (AZEVEDO et al., 2006).

Trabalhos realizados por Cek, Turan e Atik (2007) em peixes e Bashir et al. (2009) em ratos constataram que as gônadas dos grupos experimentais suplementados com *Tribulus terrestris* apresentaram-se maiores que os do grupo controle. Estes resultados foram relacionados com o possível efeito de *Tribulus terrestris* sobre a espermatogênese.

O índice gonadossomático (IGS), que determina o percentual de peso corporal alocado no testículo (AMANN, 1970), apresentou aumento no grupo de animais suplementado com o extrato etanólico. Esse fato é justificado pela ausência de diferença no peso corporal entre os grupos e por ter ocorrido o aumento do peso testicular dos animais suplementados com extrato etanólico.

Na avaliação dos possíveis efeitos de diferentes substâncias ou das alterações na espermatogênese, a análise histológica do testículo é considerada uma das estratégias mais tradicionais para analisar os parâmetros morfológicos (aspecto qualitativo do epitélio seminífero) e morfométricos (aspecto quantitativo do epitélio seminífero) dos túbulos seminíferos em condições de diferentes tratamentos em comparação com os indivíduos normais (PANNOCCHIA et al., 2008).

O diâmetro do túbulo seminífero não sofreu alteração, no entanto, o grupo suplementado com extrato etanólico apresentou aumento da altura do epitélio. Wing e Christensen (1982) afirmam que, no rato, o diâmetro tubular sofre alterações ao longo do túbulo seminífero e por isso, Morais et al. (2009) sugerem que a altura do epitélio seminífero por ser mais influenciada pelo peristaltismo tubular que por variações metodológicas é, provavelmente, um

parâmetro melhor que o diâmetro tubular para avaliação da atividade espermatogênica.

O comprimento dos túbulos seminíferos está relacionado a três parâmetros estruturais: peso testicular, diâmetro dos túbulos seminíferos e volume tubular (SOUZA; PAULA; NATALI, 2005). No presente estudo, os animais suplementados com extrato etanólico apresentaram um aumento no comprimento tubular total e, como já discutido, também apresentaram um aumento na altura do epitélio tubular. Os túbulos seminíferos correspondem ao local em que ocorre a espermatogênese. Neles as espermatogônias diploides se diferenciam numa célula haploide madura, o espermatozoide (RUSSELL; ETTLIN; SINHA HIKIM, 1990). Este processo ocorre no epitélio tubular, logo, um aumento na altura do epitélio do túbulo seminífero pode indicar um aumento no processo de produção de espermatozoides.

O percentual de túbulos seminíferos nos testículos, normalmente, estão compreendidos entre 60 e 90% na maioria das espécies (SETCHELL, 1982). Estes valores estão em conformidade com os resultados deste estudo e não apresentaram alterações entre os grupos. A proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular reflete diretamente a eficiência da produção espermática (FRANÇA; RUSSELL, 1998).

No compartimento intertubular são encontrados vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo, macrófagos, mastócitos e células de Leydig. Estas últimas produzem os andrógenos, os quais são responsáveis pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e pela manutenção da espermatogênese nos animais sexualmente maduros (FRANÇA; RUSSELL, 1998; RUSSELL; ETTLIN; SINHA HIKIM, 1990). No presente estudo, o aumento significativo no volume nuclear, volume citoplasmático e conseqüentemente o aumento do volume individual celular podem estar relacionados com o aumento da disponibilidade de testosterona. Segundo

Russel, Ettlín e Sinha Hikim (1990), apesar de não haver correlação entre o volume das células de Leydig e a produção de testosterona, a área superficial do retículo endoplasmático liso está fortemente correlacionada com a capacidade de secreção de testosterona.

A respeito da avaliação da qualidade espermática, a suplementação com o extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* não proporcionaram alterações nos animais. Entretanto, Keshtmand et al. (2014) encontraram uma melhora da qualidade espermática como o aumento da porcentagem de células normais e o aumento da motilidade dos espermatozoides de camudongos adultos tratados com extrato etanólico de *Tribulus terrestris* nas doses de 100, 300 ou 500mg/kg diante da citotoxicidade sobre sistema reprodutivo induzida por cisplastina, uma droga antitumoral, na dose de 5,5mg/kg. Esta espécie contém inúmeros compostos químicos antioxidantes que podem proteger a membrana plasmática dos espermatozoides contra a peroxidação lipídica, diminuindo o percentual de espermatozoides mortos e mantendo a morfologia normal das células.

Outro trabalho realizado para avaliar a qualidade espermática de ratos foi realizado por Elahi, Asl e Shahian (2013). O grupo controle recebeu água destilada e açúcar e os dois grupos experimentais receberam a dose de 5 mg/kg ou 10 mg/kg de uma solução à base de *Tribulus terrestris*, respectivamente, durante oito semanas. Esse estudo mostrou que, na dose de 5mg/kg, houve maior contagem de espermatozoides e uma maior maturidade destes, além da diminuição do número de espermatozoides mal formados, quando comparados com o grupo que recebeu 10mg/kg e o grupo controle. Estes resultados sugeriram que *Tribulus terrestris* melhora os parâmetros relacionados à fertilidade em machos, tais como maior concentração de espermatozoides, integridade da membrana plasmática, maior percentual de espermatozoides móveis e aumento do volume seminal.

Em nosso estudo, por se tratar de extratos e frações vegetais, é possível que haja efeitos antagônicos devido à presença de compostos químicos que levem a tal condição. Muitos desses compostos podem ter efeitos inibindo ou reduzindo a atividade farmacológica dos demais. Além disso, a presença de quimiotipos diferentes de *Tribulus terrestris* (DINCHEV et al., 2008; KUMAR; BHARDWAJ, 2012) também pode explicar o fato de que, nesse estudo, não foi possível obter melhorias nos demais parâmetros de qualidade espermática como relatados por outros autores.

CONCLUSÕES

Sugere-se que o extrato etanólico de *Tribulus terrestris* L. influencia na espermatogênese pelas alterações evidenciadas no compartimento tubular dos testículos tais como aumento do comprimento tubular total, volume tubular e altura do epitélio tubular; enquanto, as frações hexânica e aquosa solúvel em metanol promovem alterações no compartimento intertubular, pois aumentam o volume nuclear, volume citoplasmático e volume individual das células de Leydig. No entanto, o extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* não melhoram a qualidade espermática de ratos Wistar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG, à CAPES e ao CNPq pelos auxílios financeiros.

Tabela 1 Dados biométricos e morfométricos de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* (média \pm desvio padrão) (n=20)

Parâmetros	Grupos experimentais			
	Controle	Extrato etanólico	Fração hexânica	Fração aquosa solúvel em metanol
Peso Corporal (g)	375,0 \pm 40,51	360,4 \pm 45,93	377,0 \pm 32,22	416,8 \pm 59,81
Peso Testicular (g) ⁽¹⁾	1,39 \pm 0,28	2,09 \pm 0,13*	1,74 \pm 0,11	1,89 \pm 0,36*
Índice Gonadossomático (%)	0,74 \pm 0,12	1,18 \pm 0,18*	0,93 \pm 0,09	0,93 \pm 0,24
Diâmetro tubular (μ m)	287,1 \pm 30,5	286,5 \pm 26,2	303,7 \pm 23,2	294,6 \pm 10,0
Altura do epitélio tubular (μ m)	69,0 \pm 4,5	80,2 \pm 7,4*	66,3 \pm 7,5	61,4 \pm 5,9
Percentual de túbulos seminíferos	89,84 \pm 1,44	86,5 \pm 3,47	88,21 \pm 1,37	84,57 \pm 3,04
Volume tubular (mL)	1,16 \pm 0,23	1,69 \pm 0,08*	1,43 \pm 0,10*	1,49 \pm 0,24*
Comprimento tubular total (m)	18,18 \pm 4,31	26,57 \pm 3,86*	20,03 \pm 3,20	21,96 \pm 4,07
Célula de Leydig:				
Proporção de núcleo (%)	28,91 \pm 4,3	27,45 \pm 3,31	22,35 \pm 5,12	25,6 \pm 3,27
Volume nuclear (μ m ³)	85,0 \pm 16,3	119,3 \pm 23,1	155,1 \pm 31,0*	155,8 \pm 30,9*
Volume citoplasmático (μ m ³)	214,1 \pm 58,8	316,5 \pm 61,6	568,1 \pm 218,4*	463,7 \pm 139,2*
Volume individual (μ m ³)	299,1 \pm 71,2	435,8 \pm 79,7	723,2 \pm 237,3*	619,4 \pm 165,2*
Células de Leydig/g/testículo (x10 ⁶)	21,5 \pm 5,2	27,8 \pm 9,9	15,3 \pm 4,2*	20,4 \pm 7,1
Células de Leydig/testículo (x10 ⁶)	17,7 \pm 5,9	14,2 \pm 4,9	9,4 \pm 2,3	11,3 \pm 2,6

⁽¹⁾ Somatório dos pesos dos órgãos direito e esquerdo dividido por dois.

* Diferem do controle pelo teste *Dunnnett* (p<0,05);

Tabela 2 Qualidade espermática de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris* (média \pm desvio padrão) (n=20)

Parâmetros	Grupos experimentais			
	Controle	Extrato etanólico	Fração hexânica	Fração aquosa solúvel em metanol
Motilidade (% espermatozoides móveis)	68 \pm 10,37	62 \pm 25,15	51 \pm 26,78	73 \pm 19,87
Concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL)	90 \pm 41,83	80 \pm 44,72	80 \pm 27,39	60 \pm 22,36
Morfologia (% células normais)	97,2 \pm 0,84	97,4 \pm 1,14	93,8 \pm 4,66	94,4 \pm 3,65
Viabilidade (% espermatozoides viáveis)	71,6 \pm 14,9	80,2 \pm 13,5	66,4 \pm 15,8	70,2 \pm 14,1

(Versão preliminar)

REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A. D. et al. (Ed.). **The testis**. New York: Academic, 1970. v. 1, p. 433-482.
- ANDRADE, A. J. M. et al. Effects of *Tribulus terrestris* on endocrine sensitive organs in male and female wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 127, n. 1, p. 165-170, 2010.
- ARSYAD, K. M. **Result of Protodioscin (*Tribulus terrestris*) treatment in males diagnosed with infertility and impotence**. Sriwijaya: University of Sriwijaya, 1996. 10 p.
- ATTAL, J.; COUROT, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, Paris, v. 3, p. 219-241, 1963.
- AZEVEDO, M. H. F. et al. Morfometria testicular e o túbulo seminífero da onça-pintada (*Panthera onca*) adulta. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 53, n. 307, p. 374-381, 2006.
- BADKOOBEH, P. et al. Effect of nano-zinc oxide on doxorubicin- induced oxidative stress and sperm disorders in adult male Wistar rats. **Iranian Journal of Reproductive Medicine**, Yazd, v. 11, n. 9, p. 355-364, 2013.
- BASHIR, A. et al. Effects of *Tribulus terrestris* on testicular development of immature albino rats. **Biomedica**, Bogota, v. 25, n. 5, p. 63-68, Jan./June 2009.
- BEDIR, E.; KHAN, I. A. New steroidal glycosides from the fruits of *Tribulus terrestris*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, n. 12, p. 1699-1701, 2000.
- BERNDTSON, W. E. et al. Optimal replication for histometric analyses of testicular function in rats or rabbits. **Fundamental and Applied Toxicology**, Akron, v. 12, p. 291-302, 1989.

CEK, S.; TURAN, F.; ATIK, E. Masculinization of convict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*) by immersion in *Tribulus terrestris* extract. **Aquaculture International**, London, v. 15, n. 2, p. 109-119, 2007.

DINCHEV, D. et al. Distribution of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* from different geographical regions. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 69, n. 1, p. 176-186, 2008.

ELAHI, R. K.; ASL, S.; SHAHIAN, F. Study on the effects of various doses of *Tribulus terrestris* extract on epididymal sperm morphology and count in rat. **Global Veterinaria**, Deira, v. 10, n. 1, p. 13-17, 2013.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: MARTÍNEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed.). **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Communications Europe España, 1998. p. 197-219.

GAUTHAMAN, K.; ADAIKAN, P. G.; PRASAD, R. N. V. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (Protodioscin) in normal and castrated rats. **Life Sciences**, Elmsford, v. 71, n. 12, p. 1385-1396, 2002.

GAUTHAMAN, K.; GANESAN, A. P. The hormonal effects of *Tribulus terrestris* and its role in the management of male erectile dysfunction: an evaluation using primates, rabbit and rat. **Phytomedicine**, Jena, v. 15, n. 1/2, p. 44-54, Jan. 2008.

HAMMODA, H. M. et al. Chemical constituents from *Tribulus terrestris* and screening of their antioxidant activity. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 92, n. 1, p. 153-159, Aug. 2013.

KESHTMAND, Z. et al. Protective effect of *Tribulus terrestris* hydroalcoholic extract against cisplatin-induced cytotoxicity on sperm parameters in male mice. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 32, n. 2, p. 551-557, 2014.

KOSTOVA, I.; DINCHEV, D. Saponins in *Tribulus terrestris*: chemistry and bioactivity. **Phytochemistry Reviews**, Berlin, v. 4, n. 2/3, p. 111-137, July 2005.

KUMAR, A.; BHARDWAJ, A. Comparative, qualitative and quantitative chemotypic characterization among North Indian *Tribulus terrestris*. **International Research Journal of Pharmacy**, Rampur, v. 3, n. 6, p. 212-218, 2012.

LOTFI, N. et al. The effect of *Cannabis sativa* hydroalcoholic extract on sperm parameters and testis histology in rats. **International Journal of Morphology**, Temuco, v. 31, n. 1, p. 82-86, 2013.

LUNA, L. G. **Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. New York: McGraw-Hill, 1968. 258 p.

MORAIS, A. C. T. et al. Parâmetros morfofisiológicos testiculares de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geleia real. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 110-118, fev. 2009.

NEYCHEV, V. K.; MITEV, V. I. The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 101, n. 1/3, p. 319-323, 2005.

PANNOCCHIA, M. A. et al. Estratégia efetiva de fixação do testículo de ratos Wistar para avaliar os parâmetros morfológicos e morfométricos do epitélio seminífero. **ConScientiae Saúde**, São Paulo, v. 7, n. 2, p. 227-233, jun. 2008.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater: Cache River, 1990. 286 p.

SELLANDI, T. M.; THAKAR, A. B.; BAGHEL, M. S. Clinical study of *Tribulus terrestris* Linn. in oligozoospermia: a double blind study. **Clinical Research**, Thorofare, v. 33, n. 3, p. 356-364, July/Sept. 2012.

SETCHELL, B. P. Germ cells and fertilization. In: _____. **Reproduction in Mammals I**. Cambridge: Cambridge University, 1982. p. 63-101.

SINGH, S.; GUPTA, Y. K. Aphrodisiac activity of *Tribulus terrestris* Linn. in experimental models in rats. **Journal of Men's Health**, New Rochelle, v. 8, p. S75-S77, 2011. Supplement.

SOUZA, P. C.; PAULA, T. A. R.; NATALI, A. J. Efeito do exercício crônico voluntário e do sedentarismo, com e sem o uso do esteroide anabólico nandrolona, sobre os componentes do parênquima testicular de ratos adultos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 1, p. 110-118, 2005.

SU, L. et al. Steroidal saponins from *Tribulus terrestris*. **Steroids**, Stoneham, v. 74, n. 4/5, p. 399-403, 2009.

WING, T. Y.; CHRISTENSEN, A. K. Morphometric studies on rat seminiferous tubule. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 165, p. 13-25, 1982.

ZENICK, H. et al. Assessment of male reproductive toxicity: a risk assessment approach. In: _____. **Principles and methods of toxicology**. 3rd ed. New York: CRC, 1994. p. 937-988.

ANEXOS

ANEXO A Tabelas

Tabela 1A Análise de variância para ganho médio diário de peso de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	93
Tabela 2A Análise de variância para consumo médio diário de ração de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	93
Tabela 3A Análise de variância para consumo médio diário de água de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	93
Tabela 4A Análise de variância para percentual de água da carcaça de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	93
Tabela 5A Análise de variância para percentual de proteína da carcaça de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	93
Tabela 6A Análise de variância para percentual de gordura da carcaça de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	94
Tabela 7A Análise de variância para percentual de cinzas da carcaça de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	94
Tabela 8A Análise de variância para níveis séricos para glicemia em jejum de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	94
Tabela 9A Análise de variância para níveis séricos de colesterol total de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	94
Tabela 10A Análise de variância para níveis séricos de HDL-c de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	94
Tabela 11A Análise de variância para níveis séricos de LDL-c+VLDL-c de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	95
Tabela 12 A Análise de variância para níveis séricos de triacilgliceróis de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	95

Tabela 13A Análise de variância para a atividade da enzima gama glutamil transferase de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	95
Tabela 14A Análise de variância para peso relativo dos fígados de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	95
Tabela 15A Análise de variância para peso relativo dos rins direitos de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	95
Tabela 16A Análise de variância para peso relativo dos rins esquerdos de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	96
Tabela 17A Análise de variância para peso relativo do tecido adiposo epididimário direito de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	96
Tabela 18A Análise de variância para peso relativo do tecido adiposo epididimário esquerdo de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	96
Tabela 19A Análise de variância para peso relativo de baço de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	96
Tabela 20A Análise de variância para peso corporal de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	96
Tabela 21A Análise de variância para peso testicular de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	97
Tabela 22A Análise de variância para índice gonadossomático de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	97
Tabela 23A Análise de variância para diâmetro tubular de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	97
Tabela 24A Análise de variância para altura do epitélio do túbulo seminífero de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	97

Tabela 25A Análise de variância para percentual de túbulos seminíferos de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	97
Tabela 26A Análise de variância para volume tubular de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	98
Tabela 27A Análise de variância para comprimento tubular total de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	98
Tabela 28A Análise de variância para proporção de núcleo de células de Leydig de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i> .	98
Tabela 29A Análise de variância para volume nuclear de células de Leydig de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	98
Tabela 30A Análise de variância para volume citoplasmático de células de Leydig de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	98
Tabela 31A Análise de variância para volume individual de células de Leydig de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	99
Tabela 32A Análise de variância para células de Leydig por grama de testículo de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i> .	99
Tabela 33A Análise de variância para células de Leydig por testículo de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	99
Tabela 34A Análise de variância para motilidade dos espermatozoides de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	99
Tabela 35A Análise de variância para concentração dos espermatozoides de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	99
Tabela 36A Análise de variância para morfologia dos espermatozoides de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	100
Tabela 37A Análise de variância para viabilidade dos espermatozoides de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de <i>Tribulus terrestris</i>	100

Tabela 1A Análise de variância para ganho médio diário de peso de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	1,953	0,651	2,396	0,106
RESÍDUO	16	4,348	0,271		
CV (%)			42,07		

Tabela 2A Análise de variância para consumo médio diário de ração de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	26,46	8,81	1,252	0,324
RESÍDUO	16	112,69	7,04		
CV (%)			10,63		

Tabela 3A Análise de variância para consumo médio diário de água de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	67,31	22,44	1,423	0,273
RESÍDUO	16	252,29	15,77		
CV (%)			13,79		

Tabela 4A Análise de variância para percentual de água da carcaça de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	7,14	2,3801	2,862	0,07
RESÍDUO	16	13,30	0,8315		
CV (%)			1,31		

Tabela 5A Análise de variância para percentual de proteína da carcaça de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	59,29	19,763	5,248	0,01
RESÍDUO	16	60,25	3,765		
CV (%)			10,89		

Tabela 6A Análise de variância para percentual de gordura da carcaça de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	4,142	1,381	1,371	0,288
RESÍDUO	16	16,118	1,007		
CV (%)			15,50		

Tabela 7A Análise de variância para percentual de cinzas da carcaça de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	0,561	0,1870	1,177	0,35
RESÍDUO	16	2,543	0,1589		
CV (%)			9,81		

Tabela 8A Análise de variância para níveis séricos para glicemia em jejum de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	511,4	170,5	1,7	0,212
RESÍDUO	16	1626,6	101,7		
CV (%)			7,53		

Tabela 9A Análise de variância para níveis séricos de colesterol total de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	37,6	12,5	0,38	0,77
RESÍDUO	16	524,0	32,8		
CV (%)			5,48		

Tabela 10A Análise de variância para níveis séricos de HDL-c de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	101,5	33,82	1,50	0,25
RESÍDUO	16	358,6	22,42		
CV (%)			11,69		

Tabela 11A Análise de variância para níveis séricos de LDL-c+VLDL-c de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	61,6	20,53	0,466	0,71
RESÍDUO	16	705,4	44,09		
CV (%)			10,39		

Tabela 12A Análise de variância para níveis séricos de triacilgliceróis de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	753,2	251,1	3,1	0,0564
RESÍDUO	16	1296,0	81,0		
CV (%)			7,08		

Tabela 13A Análise de variância para a atividade da enzima gama glutamil transferase de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	2,13	0,71	0,46	0,70
RESÍDUO	16	24,27	1,51		
CV (%)			43,26		

Tabela 14A Análise de variância para peso relativo dos fígados de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	0,108	0,036	0,269	0,847
RESÍDUO	16	2,15	0,134		
CV (%)			7,856		

Tabela 15A Análise de variância para peso relativo dos rins direitos de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	0,006	0,020	0,607	0,62
RESÍDUO	16	0,053	0,003		
CV (%)			9,31		

Tabela 16A Análise de variância para peso relativo dos rins esquerdos de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	0,008	0,002	0,626	0,608
RESÍDUO	16	0,074	0,004		
CV (%)			4,26		

Tabela 17A Análise de variância para peso relativo do tecido adiposo epididimário direito de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	0,7235	0,2412	1,657	0,216
RESÍDUO	16	2,3288	0,1456		
CV (%)			34,39		

Tabela 18A Análise de variância para peso relativo do tecido adiposo epididimário esquerdo de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	0,7209	0,2403	2,34	0,112
RESÍDUO	16	1,6431	0,1027		
CV (%)			30,55		

Tabela 19A Análise de variância para peso relativo de baço de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	0,0064	0,002	1,226	0,333
RESÍDUO	16	0,027	0,001		
CV (%)			12,27		

Tabela 20A Análise de variância para peso corporal de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	8756	2919	1,395	0,28
RESÍDUO	16	33470	2092		
CV (%)			11,96		

Tabela 21A Análise de variância para peso testicular de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	1,33	0,44	7,45	0,002
RESÍDUO	16	0,95	0,05		
CV (%)			13,75		

Tabela 22A Análise de variância para índice gonadossomático de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	0,49	0,164	5,847	0,0067
RESÍDUO	16	0,45	0,028		
CV (%)			17,80		

Tabela 23A Análise de variância para diâmetro tubular de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	969	322,9	0,57	0,641
RESÍDUO	16	9006	562,9		
CV (%)			8,09		

Tabela 24A Análise de variância para altura do epitélio do túbulo seminífero de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	950,8	316,9	7,63	0,002
RESÍDUO	16	664,1	41,5		
CV (%)			9,30		

Tabela 25A Análise de variância para percentual de túbulos seminíferos de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	77,07	25,69	4,07	0,02
RESÍDUO	16	100,95	6,31		
CV (%)			2,87		

Tabela 26A Análise de variância para volume tubular de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	0,707	0,235	7,681	0,002
RESÍDUO	16	0,491	0,030		
CV (%)			12,13		

Tabela 27A Análise de variância para comprimento tubular total de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	194,9	64,97	4,29	0,021
RESÍDUO	16	241,8	15,12		
CV (%)			17,92		

Tabela 28A Análise de variância para proporção de núcleo de células de Leydig de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	120,2	40,06	2,411	0,105
RESÍDUO	16	265,8	16,61		
CV (%)			15,62		

Tabela 29A Análise de variância para volume nuclear de células de Leydig de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	17121	5707	8,41	0,0013
RESÍDUO	16	10857	679		
CV (%)			20,23		

Tabela 30A Análise de variância para volume citoplasmático de células de Leydig de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	2,68	0,89	11,61	0,00027
RESÍDUO	16	1,23	0,07		
CV (%)			0,07		

Tabela 31A Análise de variância para volume individual de células de Leydig de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	2,25	0,75	12,74	0,00016
RESÍDUO	16	0,94	0,05		
CV (%)			0,046		

Tabela 32A Análise de variância para células de Leydig por grama de testículo de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	196,7	65,68	3,69	0,034
RESÍDUO	16	283,9	17,74		
CV (%)			32,06		

Tabela 33A Análise de variância para células de Leydig por testículo de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	399,8	133,26	2,76	0,07
RESÍDUO	16	770,6	48,16		
CV (%)			32,66		

Tabela 34A Análise de variância para motilidade dos espermatozoides de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	1345	448,3	0,968	0,432
RESÍDUO	16	7410	463,1		
CV (%)			33,88		

Tabela 35A Análise de variância para concentração dos espermatozoides de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	2375	791,7	0,633	0,604
RESÍDUO	16	20000	1250,0		
CV (%)			45,62		

Tabela 36A Análise de variância para morfologia dos espermatozoides de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	52,2	17,4	1,881	0,173
RESÍDUO	16	148,0	9,25		
CV (%)			3,18		

Tabela 37A Análise de variância para viabilidade dos espermatozoides de ratos suplementados com extrato e frações do fruto de *Tribulus terrestris*

FV	GL	SQ	QM	F	P > F
EXTRATOS	3	510	169,9	0,795	0,514
RESÍDUO	16	3418	213,6		
CV (%)			20,27		

Anexo B Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da
Universidade Federal de Lavras



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 027/14, relativo ao projeto intitulado Investigação do efeito androgênico de diferentes extratos obtidos do fruto de Tribulus terrestris L. (Zygophyllaceae) em ratos machos, que tem como responsável Raimundo Vicente de Sousa está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Comissões Permanentes/PRP-UFLA), tendo sido aprovado na reunião de 31/07/2014.

Início do projeto:01/10/2014 - Término do projeto:28/02/2015.
Espécie: Rato - Quantidade de animais: 30.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 027/14, related to the project entitled "Investigation of androgenic effect by different extracts of Tribulus terrestris L. fruit (Zygophyllaceae) in male rats", under the supervision of Raimundo Vicente de Sousa, is in agreement with the Ethics Principles in Animal Experimentation, adopted by the Institutional Animal Care and Use Committee (Standing Committees/PRP-UFLA), and was approved in July 31, 2014.

Project's beginning:01/10/2014 - Project's end:28/02/2015.
Species: Rato - Number of animals: 30.


Lavras, 31 de julho de 2014


Prof. Gabriela Rodrigues Sampaio
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa/Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200-000 - Lavras, MG - Brasil
Tel. +55 (35) 3829-5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br

Anexo C Laudo do fruto de *Tribulus terrestris*

SPSPharm® - SPSInformática Ltda - 55(31) 3292-4949

 CATEDRAL <small>CIENCIA E CONSCIENCIA</small>	INDUSTRIA FARMACEUTICA CATEDRAL LTDA
CERTIFICADO DE ANÁLISE	
Página: 1 / 1	

Dados	
Nome Comum TRIBULUS (TRIBULUS TERRESTRIS)	Nome Científico TRIBULUS TERRESTRIS
Família Botânica	Parte Utilizada FRUTO
Forma Farmacêutica	Data de Fabricação 03/2014
	Data de Validade 12/2017
Lote 00677/14	País de Origem CHINA, REPUBLICA POPULAR
	Relação Droga/Extrato
	Irradiação

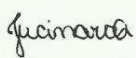
Análise	Especificação	Resultado
	FISICO-QUIMICO	
(1) COR	Castanho	Castanho
(1) ODOR	Aromatico	Aromatico
(2) ALCALOIDES	Positivo	Positivo
(2) POLIFENOLIS	Positivo	Positivo
(2) SAPONINAS	Positivo	Positivo
(6) UMIDADE	Maximo 15,0%	8,33%
(6) CINZAS TOTAIS	Entre 2,0 e 9,0%	8,20%
(6) ELEMENTOS ESTRANHOS	Maximo 2,0%	Ausentes
(1) MACRO/MICROSCOPIA	Conforme descrição para a especie	De acordo


Referência Bibliográfica

(1) - Metodologia Interna
(2) - Cecília Belló Alice (et al.). Plantas Medicinais de Uso Popular: Atlas Farmacopéutico - Campos: Ed. De UELMA, 1995.
(16) - FARMACOLOGIA BRASILEIRA 5ª ED. V. 1, BRASÍLIA: ANVISA, 2010.

Observações:

RESULTADO: APROVADO
DATA DE APROVAÇÃO: 03/04/2014


JUCIMARA QUEIROGA JUNIA PEREIRA


Tarciano Batista Teixeira
Controlador de Qualidade

RUA HUM - Nº. 288, B: NOVA PAMPULHA
VESPASIANO, MG - CEP: 33200-000 - TEL: 31 3629 2000 EMAIL: CATEDRAL@GOLD.COM.BR