

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO ALCALOIDE BOLDINA SOBRE O
COMPORTAMENTO SEXUAL DA NINHADA DE RATAS WISTAR TRATADAS
DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL**

MURIEL RODRIGUES FERRAZ DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE

2017/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DO ALCALOIDE BOLDINA SOBRE O
COMPORTAMENTO SEXUAL DA NINHADA DE RATAS WISTAR TRATADAS
DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL**

Autora: Muriel Rodrigues Ferraz de Oliveira

**Monografia apresentada à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para a
obtenção da graduação em Medicina
Veterinária.**

**Orientador: Prof. Dr. João Roberto Braga de
Mello**

PORTO ALEGRE

2017/2

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter cuidado de cada mínimo detalhe desde o dia em que escolhi minha profissão, por ter me guiado e capacitado para chegar até onde cheguei. “[...] pois eu sei em quem tenho crido e estou certo de que Ele é poderoso [...]” (2 Timóteo 1:12).

Aos meus pais, Valdir e Lucia, pelo amor incondicional, por acreditarem em mim, pelo apoio em todos os momentos, por chorarem, sorrirem e viverem a faculdade junto comigo. Essa vitória é para vocês, nós conseguimos! Muito obrigada!

Ao Humberto, meu parceiro, melhor amigo e namorado. Agradeço-te por todos os momentos em que me olhou com carinho e paciência e deu teu melhor sorriso para me motivar!

Ao meu professor orientador Dr. João Roberto Braga de Mello, pela disposição, paciência e aconselhamento durante todo o trabalho. Serei eternamente grata pela oportunidade de aprender com o senhor. Muito obrigada!

A Lais, por ter me ensinado tanto durante o período em que passamos juntas. Por ter me oportunizado realizar a monografia com parte do seu trabalho, sempre me ajudando e aconselhando. Muito obrigada!

A Amanda, que além de me apresentar o Laboratório de Farmacologia e Terapêutica / UFRGS, através do qual pude descobrir minha paixão por pesquisa, também foi sempre muito solícita em me ensinar. Muito obrigada!

Aos professores Mauro Riegert Borba e Luís Gustavo Corbellini, por prontamente me auxiliarem nas estatísticas do meu trabalho. Obrigada!

Aos meus amigos, Taciane, Daniela, Taís, Rosane, Sybele, Amaro, Thatiane, Ester e Saulo, por terem me proporcionado enfrentar essa difícil etapa de forma mais leve graças às boas conversas, risadas e desabafos em tantos momentos dessa jornada.

Aos demais amigos e familiares, por todas as orações e carinho, por entenderem meus momentos de ausência e, finalmente, por torcerem por mim sempre.

RESUMO

A utilização de plantas como medicamentos tem acompanhado o homem através do tempo (SOUSA *et al.*, 2011). A boldina é o principal alcaloide encontrado no *Peumus boldus*, uma planta muito utilizada na medicina tradicional, principalmente por suas propriedades digestivas. Diversos estudos sobre os efeitos benéficos do *Peumus boldus* e do alcaloide boldina já foram realizados, entretanto, poucos são os que estudam os efeitos adversos causados por seu uso. No Brasil a legislação que regulamenta a realização de testes pré-clínicos de toxicidade para medicamentos fitoterápicos é a Resolução N° 90 de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil (ANVISA, 2004). Este estudo objetivou avaliar a exposição pré e perinatal das progênies (F1) ao alcaloide boldina sobre o desenvolvimento sexual e comportamental, investigando as potenciais alterações no comportamento sexual de machos e fêmeas adultos inexperientes (Segmento III). O presente estudo foi realizado por meio de observação, por um período de 30 minutos, de casais não consanguíneos escolhidos aleatoriamente das ninhadas de ratas tratadas durante o período gestacional nas doses do alcaloide boldina de 1 mg/kg, 10 mg/kg e 100 mg/kg. Os parâmetros avaliados foram: latência para primeira monta, latência para primeira intromissão, número de montas incompletas, números de intromissões, latência para ejaculação, latência para primeira monta pós-ejaculação, latência para primeira intromissão pós-ejaculação, número de montas incompletas pós-ejaculação, número total de intromissões pós-ejaculação e número total de ejaculações. Não foram constatadas alterações relevantes nos diversos parâmetros investigados, não havendo entre os resultados indicações de que o alcaloide boldina possa causar efeitos tóxicos sobre o comportamento sexual de ninhadas quando administrado em doses repetidas durante a gestação.

Palavras-chave: Medicamentos fitoterápicos. *Peumus boldus*. Boldina. Toxicidade reprodutiva. Comportamento sexual.

ABSTRACT

The use of plants as medicines has accompanied man through time (SOUSA et al., 2011). The boldine is the main alkaloid found in *Peumus boldus*, a plant widely used in traditional medicine, mainly for its digestive properties. Several studies on the beneficial effects of *Peumus boldus* and the boldine alkaloid have already been carried out, however, few are those that study the adverse effects caused by its use. In Brazil, the legislation that regulates the pre-clinical tests of toxicity for phytotherapeutic drugs is Resolution No. 90 of March 16, 2004 of the Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil (ANVISA, 2004). This study aimed to evaluate the pre and perinatal exposure of the progenies (F1) to the boldine alkaloid on sexual and behavioral development, investigating the potential changes in the sexual behavior of inexperienced adult males and females (Segment III). The presente study was carried out by observing, for a period of 30 minutes, non-consanguineous couples randomly selected from the litters of rats treated during the gestational period at doses of 1 mg/kg, 10 mg/kg and 100 mg/kg of boldine. The parameters evaluated were: latency for first mount, latency for first intromission, number of incomplete mounts, numbers of intromissions, latency for ejaculation, latency for first post-ejaculation mount, latency for first post-ejaculation intromission, number of incomplete mounts post-ejaculation, total number of post-ejaculation intromissions, and total number of ejaculations. No relevant changes were found in the different investigated parameters. There were no indications that the boldine alkaloid could cause toxic effects on the sexual behavior of litters when administered in repeated doses during pregnancy.

Key words: Phytotherapeutic drugs. *Peumus boldus*. Boldine. Reproductive toxicity. Sexual behavior.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura química do alcaloide Boldina..... 10
- Figura 2. Efeitos da dopamina em três sistemas neurais integradores. Estímulos de uma fêmea em estro e/ou o ato de copular provocam a liberação de dopamina em cada sistema. A dopamina no trato nigroestriatal promove a iniciação de padrões somatomotores da cópula. Dopamina no sistema mesolímbico aumenta o comportamento geral de apetite. Dopamina na área pré-óptica medial (MPOA) facilita os reflexos genitais, melhorando especificamente a motivação sexual, e promovendo padrões de cópula somatomotores..... 13
- Figura 3. Características de comportamento sexual de machos e fêmeas adultos observados durante a análise do acasalamento..... 20

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Parâmetros de latência de machos inexperientes expostos via útero a solução salina 0,9% (CN), 0,01% de Boldina (1BD), 0,1% de Boldina (10BD) e 1% de Boldina (100BD). Os dados estão expressos em média \pm EPM. N = número de animais..... 23
- Tabela 2. Parâmetros totais de número de montas incompletas e intromissões pré e pós-ejaculação, e número de ejaculações de machos inexperientes expostos via útero a solução salina 0,9% (CN), 0,01% de Boldina (1BD), 0,1% de Boldina (10BD) e 1% de Boldina (100BD). Os dados estão expressos em média \pm EPM. N = número de animais..... 24

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVO	16
3 MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 Boldina	17
3.2 Protocolo experimental	17
3.2.1 Animais.....	17
3.2.2 Delineamento experimental.....	18
3.2.3 Comportamento sexual.....	18
3.2.4 Análise estatística	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5 CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como medicamentos tem acompanhado o homem através do tempo (SOUSA *et al.*, 2011). Seu uso é reconhecido pela Organização Mundial da Saúde como sendo uma alternativa viável e importante às populações dos países em desenvolvimento (WHO, 2005). O uso de plantas medicinais no tratamento ou na prevenção de enfermidades em animais tem sido repassado de geração para geração, e, ainda hoje, é bastante empregada no cotidiano por proprietários principalmente da zona rural (LIMA *et al.*, 2012). Segundo dados pesquisados por Giordani *et al.*, (2016), o boldo (*Peumus boldus*) é a segunda planta medicinal mais citada e utilizada para fins terapêuticos no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, sendo disponibilizada em forma de chá a uma porcentagem considerável (25,2%) de animais domésticos e de produção. O volume administrado é, na maioria das vezes, a mesma quantidade ingerida pelos próprios proprietários, ou seja, uma xícara/dose, e grande parte da população desconhece os potenciais efeitos tóxicos relacionados a utilização inadequada e superdosagem das plantas, e que há a possibilidade de interação medicamentosa destas com fármacos alopatícos (GIORDANI *et al.*, 2016).

Um grande problema surge da utilização desses fitoterápicos, a crença de que os mesmos não possuam efeitos adversos e tóxicos. Muito disso se deve ao demasiado apelo comercial decorrente do intenso movimento cultural dos naturalistas que aqueceu, em todo o mundo, o consumo de plantas medicinais (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Segundo Veiga Junior *et al.* (2005), a comercialização destas plantas é apoiada em propagandas que prometem “benefícios seguros, já que se trata de fonte natural”. Contudo, as supostas propriedades farmacológicas anunciadas muitas vezes não possuem validade científica, devido à falta de investigação ou comprovação através de testes científicos pré-clínicos ou clínicos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Em estudo realizado por Almeida *et al.*, (2006) uma significativa parcela (23,0%) de Médicos Veterinários entrevistados acreditam que a Fitoterapia não possui desvantagens, entretanto, os poucos estudos nesta área dificultam o seu uso, demonstrando que se faz necessário o constante aperfeiçoamento referente a avaliações e estudos a respeito de plantas com potencial medicinal.

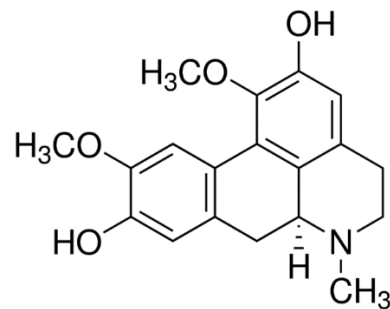
No Brasil há uma regulamentação exigindo que tais produtos apresentem eficácia e segurança comprovadas (BRASIL, 1996; BRASIL, 2004). As legislações brasileira e internacional exigem uma rigorosa avaliação das características dos fitoterápicos e fármacos em geral, para que os mesmos possam ser produzidos ou disponibilizados para consumo. Diferentes

exigências ocorrem nos diversos países ou blocos econômicos, mas em geral, os principais protocolos a serem seguidos são os emitidos pela Europa através da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), pelos Estados Unidos da América através do *Food and Drug Administration* (FDA) (SILVA *et al.*, 2003). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão, no Brasil, responsável por regular o registro de medicamentos fitoterápicos de uso humano, e prevê a realização de estudos de toxicidade pré-clínica. O guia emitido por esse órgão tem por finalidade indicar métodos padronizados para estudos de toxicologia pré-clínica para fitoterápicos incluindo toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas (longa duração), e avaliação toxicológica de medicamentos fitoterápicos de uso tópico. Quando o medicamento for indicado para administração de longa duração, é previsto o uso de ensaios de toxicidade reprodutiva. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é o órgão responsável pelo registro de medicamentos para uso veterinário, e apresenta as mesmas exigências quanto à avaliação toxicológica prevista em sua normativa Decreto 5.053 de 2004 (BRASIL, 2004).

Os estudos mais utilizados para avaliações de toxicidade reprodutiva são divididos em três segmentos, adaptando-se as normas da ANVISA com as normas internacionais guiadas pela *Environmental Protection Agency* (EPA) e recomendada pela OECD e pela FDA, são eles: Segmento I “Toxicidade crônica e reprodutiva”, onde são avaliados os efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas antes e durante o acasalamento; Segmento II “Toxicidade pré-natal, que caracteriza-se pelo estudo de teratogenicidade, com exposição da progênie durante a fase de organogênese; e Segmento III “Toxicidade peri e pós-natal”, através da avaliação de efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação (OECD, 1998; LEMONICA *et al.*, 2001).

O *Peumus boldus* Molina - Monimiaceae, também conhecido como boldo-verdadeiro, é natural do Chile (MENGUE *et al.*, 2001), seu principal alcaloide é a boldina, (S)-2,9-Dihidroxi-1,10-dimetoxi-apomorfina (Figura 1), que apresenta diversificadas atividades farmacológicas, como atividade citoprotetora, antitumoral, anti-inflamatória, antipirética, antiplaquetária, entre outras (O'BRIEN *et al.*, 2006).

Figura 1. Estrutura química do alcaloide Boldina



Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2017

É popularmente empregado devido suas propriedades digestivas (JIMÉNEZ; SPEISKY, 2000). As atividades farmacológicas principalmente atribuídas a este composto são: atividade estimulante de secreções gástricas, facilitando a digestão (BRUN, 1936; PLANCHON *et al.*, 1946; COIMBRA; SILVA, 1958; PARIS; MOYSE, 1967; HOFFMAN, 1981; BISSET; WICHTL, 1994; GUPTA, 1995; AMERICAN BOTANICAL COUNCIL, 1995; DUKE, 2000); ação como antidispéptico (AMERICAN BOTANICAL COUNCIL, 1995; PDR, 2000; BRUNETON, 2001); atividade antiespasmódica (PDR, 2000); uso no tratamento de cálculos biliares, cistite e colelitíase acompanhada de dor (BRUN, 1936; PARIS; MOYSE, 1967; NEWALL *et al.*, 2002) , atividade diurética (HÉRAIL, 1927; PARIS; MOYSE, 1967; BISSET; WICHTL, 1994; NEWALL *et al.*, 2002). As indicações terapêuticas devem estar relacionadas ao tratamento sintomático de distúrbios digestivos leves e como adjuvante na constipação (ES COP, 1997).

A boldina é o alcaloide predominante encontrado nas folhas e cascas do boldo (*Peumus boldus*) (SPEISKY, CASSELS, 1994; O'BRIEN *et al.*, 2006), nas folhas sua concentração é em torno de 0,14% (QUEZADA *et al.*, 2004; GOTTELAND *et al.*, 2004), já nas cascas é de até 6% (URZÚA; ACUÑA, 1983; QUEZADA *et al.*, 2004).

Diversos estudos sobre os efeitos benéficos do *Peumus boldus* e do alcaloide boldina já foram realizados, entretanto, poucos são os que estudam os efeitos adversos causados por seu uso. Almeida *et al.* (2000), observam alterações anatômicas e nos blastocistos e alguma atividade abortiva quando administrado extratos de boldo (*Peumus boldus*) e boldina durante a gestação. Contudo, a dose utilizada de boldina neste estudo, de 500mg/kg e 800mg/kg, é alta se levada em conta a concentração do alcaloide encontrada em folhas de *Peumus boldus* (0,14%) (QUEZADA *et al.*, 2004; GOTTELAND *et al.*, 2004), e também é grande se comparada a doses administradas em estudos que mostram os efeitos benéficos da planta. O estudo em questão não avaliou

possíveis efeitos no desenvolvimento da prole. Verificou-se, ainda, que o boldo (*Peumus boldus*) quando administrado em animais durante o período de pré-implantação gera um significativo aumento da perda embrionária, um provável motivo pode ser o efeito relaxante sobre a mobilidade tubária (ALMEIDA; LEMÔNICA, 2000).

O alcaloide boldina parece demonstrar atração por receptores dopaminérgicos (ASENCIO *et al.*, 1999), e quando administrado parenteralmente, a boldina exerce algumas ações centrais inibitórias que, provavelmente, são mediadas por meio do bloqueio de receptores de dopamina D2 (ZETLER, 1988). WALSTAB *et al.* (2014) demonstra que o alcaloide boldina inibe de forma competitiva os receptores 5-HT3 humano. O mesmo parece bloquear, também, a atividade α -adrenérgica direta em *vas deferens* de rato (DE LA HERAS *et al.*, 1990), e em estudo realizado por Ivorra *et al.* (1993), foi demonstrado que este alcaloide se comporta como um bloqueador α -adrenérgico cardiovascular. Relatos afirmam que a boldina compartilha a propriedade do alcaloide ioimbina para interagir com α 2-adrenoreceptores (FABEIRO *et al.*, 2000 *apud* ELTZE *et al.*, 2002).

O comportamento sexual é frequentemente considerado como parte de um conjunto de padrões comportamentais que tem como propósito ou finalidade a manutenção das espécies; o adequado desempenho sexual é fundamental para a produção animal, isto posto, disfunções no comportamento sexual podem afetar negativamente o potencial reprodutivo de animais domésticos (ÅGMO, 1997). Este pode ser considerado como um fenômeno que depende de fatores intrínsecos e extrínsecos; o circuito neural subjacente a este comportamento vem sendo estudado e investigado a anos, especialmente em ratos (OLIVIER *et al.*, 2007).

O comportamento proporciona o vínculo entre a fisiologia interna de um animal e o ambiente externo; comportamentos específicos, definíveis e previsíveis são produzidos por variações específicas na função fisiológica (WEBER, 1997). Mudanças na natureza ambiental ou de respostas biológicas internas tem o potencial de induzir alterações comportamentais, alterações estas que podem modificar sutilmente a capacidade de sobrevivência de uma determinada população (WEBER, 1997).

Ao analisarmos o comportamento sexual de machos, são observados a motivação e o desempenho sexual, mas apesar da distinção, ambos se relacionam intimamente (MEISEL; SACHS, 1994 *apud* RODRIGUES-ALVES, 2007). A procura por contato sexual com outro animal é parte de um processo que comumente refere-se como motivação sexual ou libido; e o desempenho sexual ou potência é a eficiência de ereção e orientações penianas (RODRIGUES-ALVES, 2007).

O comportamento copulatório de ratos caracteriza-se por uma série de montas, com ou sem inserção vaginal, aproximadamente uma vez a cada 30 a 120 segundos, que eventualmente culminam na ejaculação (BITRAN; HULL, 1987). Durante a monta o macho se aproxima da retaguarda da fêmea e agarra seus flancos com as patas dianteiras e inicia uma série de esforços superficiais com sua pélvis, neste momento, o pênis do macho é parcialmente ereto e ele possui uma ou ambas as patas traseiras no chão (HULL *et al.*, 2006). A fêmea responde a cada monta com um movimento denominado “comportamento de lordose”, que corresponde a dorsoflexão da coluna vertebral e desvio da cauda para o lado, permitindo o acesso a vagina pelo macho (BITRAN; HULL, 1987). A latência para primeira monta (LPM) é uma medida de motivação sexual (PFAUS, 1990) e, em geral, deve ser menor que um minuto (ÅGMO, 1997). O número de montas é bastante variável e, provavelmente, reflete a motivação sexual, porém, pode ser confundido com outros fatores (ÅGMO, 1997).

A intromissão é considerada um evento determinante da copulação, onde o macho, ao detectar a vagina da fêmea, executa um impulso intravaginal mais profundo, seguido de um rápido salto para desmontar da fêmea; após cada intromissão, geralmente, o macho realiza movimentos de “grooming” com a finalidade de limpar seu órgão genital (HULL *et al.*, 2006). Intromissões requerem ereções penianas e atividades coordenadas de músculos estriados do pênis e, portanto, não podem ser consideradas inteiramente determinadas pela motivação sexual (ÅGMO, 1997). A latência para primeira intromissão (LPI) usualmente é a mesma que a LPM, mas também pode ser mais longa (ÅGMO, 1997). O número de intromissões demonstra a facilidade com que os reflexos ejaculatórios são ativados (ÅGMO, 1997).

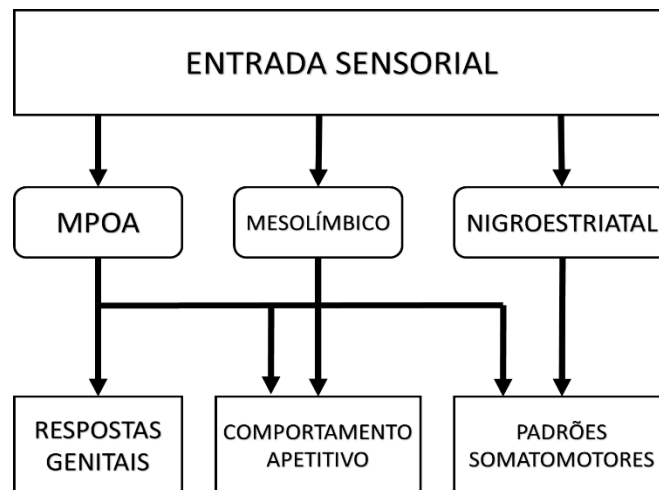
A ejaculação caracteriza-se comportamentalmente por um impulso mais profundo e longo, seguido de uma desmonta lenta e relaxada, sendo que, grande parte dos mamíferos machos ejacula somente após receber estimulação de múltiplas intromissões (HULL *et al.*, 2006). Em seguida a ejaculação, o macho geralmente se limpa e entra em um período de suspensão sexual, onde o intervalo pós-ejaculatório em ratos dura em torno de 5 a 10 minutos (HULL *et al.*, 2006).

Durante anos, o estudo do comportamento sexual centrou-se predominantemente nos mecanismos hormonais e nos locais neuroanatômicos importantes para seu controle, entretanto, é sabido que uma das vias pelas quais os hormônios esteroides podem influenciar o comportamento é aumentando ou diminuindo a síntese, liberação e/ou eficácia de determinados neurotransmissores em locais neurais específicos (BITRAN; HULL, 1987).

Entre os neurotransmissores importantes que influenciam no comportamento, encontra-se a dopamina (DA). A DA não desencadeia o comportamento sexual diretamente, mas facilita o acesso de estímulos às vias de produção hormonal (HULL *et al.*, 1997). A motivação sexual e

as respostas genitais e somatomotoras em ratos machos são controladas por três grandes sistemas integradores (HULL, 1995), a Figura 3 mostra os efeitos da dopamina nestes três sistemas neurais integradores. A entrada sensorial de uma fêmea receptiva e/ou o ato da copulação é um fator chave, pois provoca a liberação de dopamina em cada um desses sistemas (MAS, 1995).

Figura 2. Efeitos da dopamina em três sistemas neurais integradores. Estímulos de uma fêmea em estro e/ou o ato de copular provocam a liberação de dopamina em cada sistema. A dopamina no trato nigroestriatal promove a iniciação de padrões somatomotores da cópula. Dopamina no sistema mesolímbico aumenta o comportamento geral de apetite. Dopamina na área pré-óptica medial (MPOA) facilita os reflexos genitais, melhorando especificamente a motivação sexual, e promovendo padrões de cópula somatomotores.



Fonte: Adaptado de HULL *et al.*, 1997.

Estudos revelaram que mudanças de níveis de dopamina no MPOA podem regular as influências autonômicas sobre os reflexos genitais e também podem focar a motivação masculina em atividades especificamente sexuais aumentando, dessa forma, a taxa e a eficiência da cópula (HULL *et al.*, 1997).

A ereção do pênis é um reflexo espinhal sob controle inibitório do sistema nervoso central (supraespinhal); estímulos visuais, táteis, olfatórios e imaginativos das áreas corticais superiores do cérebro estão integrados na MPOA do hipotálamo e são mediados por neurônios dopaminérgicos e oxitocinérgicos (BRIONI; MORELAND, 2006). Esses neurônios enviam impulsos que resultam na liberação de óxido nítrico (NO) a partir de neurônios nitrérgicos no corpo cavernoso do pênis induzindo vasodilatação (devido à ativação de guanilato ciclase solúvel em músculo liso pelo NO), resultando na expansão do corpo cavernoso após preenchimento e veno-oclusão e conseguinte ocorrência da ereção (BRIONI; MORELAND, 2006).

Hull *et al.* (1984), utilizando ratos Long-Evans, estudou os efeitos da administração perinatal de drogas antagonistas e agonistas de dopamina no comportamento sexual da prole. Foram demonstrados déficits no comportamento sexual dos descendentes resultantes de tratamento materno a longo prazo com drogas que afetam preferencialmente a atividade da dopamina, demonstrando que, aparentemente, qualquer influência exógena sobre a atividade da dopamina durante períodos sensíveis de desenvolvimento pode comprometer o desenvolvimento masculino.

Outro neurotransmissor de grande importância é a serotonina, cujo os receptores 5-HT influenciam na expressão do comportamento sexual. Segundo Pfaus *et al.* (1995), agonistas de receptores 5-HT tem um efeito facilitador sobre o comportamento de copulação. Maswood *et al.* (1997) realizou um estudo com ratas ovariectomizadas preparadas hormonalmente com benzoato de estradiol e progesterona, cujo o tratamento constou em infusões no núcleo ventromedial do hipotálamo (VMN) com um antagonista do receptor 5-HT₃ (tropisetron). Onde foi observado um declínio dose-dependente na relação lordose para monta (número de respostas de lordose pela fêmea dividido pelo número de montas pelo macho) e na qualidade do reflexo de lordose com dose de 500 ng de tropisetron, que foi a mudança mais consistente no comportamento de lordose. Em resumo, foi constatado que o antagonista do receptor 5-HT₃, tropisetron, inibiu o comportamento sexual feminino.

As catecolaminas têm sua parcela de participação no desenvolvimento sexual, seus receptores α_2 adrenérgicos regulam muitas funções no comportamento copulatório de machos. A Ioimbina, um antagonista de receptores α_2 adrenérgicos, aumenta a intensidade do comportamento de cópula do rato macho (PETERS *et al.*, 1988). Existe uma quantidade substancial de dados que sugerem que o bloqueio do receptor α_2 adrenérgico estimula o comportamento sexual do rato macho (VIITAMAA; HAAPALINNA; ÅGMO, 2006).

Benelli *et al.* (1993) investigou o papel de receptores α_2 adrenérgicos centrais no comportamento sexual de ratos machos, administrando via intraperitoneal (i.p.) um agonista seletivo (Guanabenz) e um antagonista seletivo (Efaroxan) tanto para ratos machos Wistar sexualmente experientes quanto para machos inexperientes. Observou-se que em animais com experiência sexual, o guanabenz, na dose de 1 mg/kg i.p., aumentou as latências de monta e intromissão, o intervalo entre cópulas e o intervalo pós-ejaculação, já as frequências de monta e intromissão e a eficácia copulatória foram reduzidas. Quando administrado efaroxan, na dose de 10 mg/kg i.p., houve uma redução nas latências de monta e intromissão. Em animais sexualmente inexperientes, o guanabenz reduziu ligeiramente a porcentagem de animais que alcançaram a

ejaculação e aumentou o intervalo pós-ejaculatório. Já o efaroxan, na dose de 10 mg/kg i.p., aumentou a porcentagem de animais que alcançaram a ejaculação e reduziu a latência para ejaculação. Com estes resultados é possível indicar que o comportamento sexual masculino é positivamente modulado por sistemas cerebrais noradrenérgicos.

Os estudos pré-clínicos em modelos animais, tem por objetivo apontar substâncias que demonstrem capacidade de alterar aspectos fisiológicos como reprodução, fertilidade e comportamento da prole. A exposição de ratas *Wistar* prenhas ao alcaloide boldina e a avaliação dos filhotes, no presente estudo, visam investigar potenciais alterações na reprodução e comportamento sexual da prole F1, de forma a determinar os aspectos toxicológicos deste alcaloide.

É de extrema importância que se realize ensaios de avaliação toxicológica para atestar que os compostos químicos presentes no boldo (*Peumus boldus*) não exercem atividades tóxicas que inviabilizem seu uso para fins terapêuticos.

2 OBJETIVO

Avaliar a exposição pré e perinatal das progênies (F1) ao alcaloide boldina sobre o desenvolvimento sexual e comportamental, investigando as potenciais alterações no comportamento sexual de machos e fêmeas adultos inexperientes (Segmento III).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Boldina

A boldina foi obtida da Sigma-Aldrich (lote BCBN6341V) em forma de pó em frascos de vidro contendo 1,5g do composto. Foi analisada pela mesma empresa por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, obtendo um grau de pureza de 100.0%

3.2 Protocolo experimental

3.2.1 Animais

Foram utilizados 320 ratos albinos Wistar (80 machos e 240 fêmeas) com idade inicial de 90 dias e padrão sanitário convencional, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL). É preconizada a utilização destes animais por serem dóceis e possuírem excelente desempenho reprodutivo. A maturidade sexual dos machos é alcançada logo após a puberdade (entre 60 e 75 dias de vida), sua fertilidade máxima encontra-se entre 100 e 300 dias, e a senescência reprodutiva ocorre aproximadamente aos 260 dias de idade (EBISUI *et al.*, 2009 *apud* SANTOS, 2017).

Durante o período experimental, os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) em condições controladas e constantes de umidade relativa do ar (50% UR, \pm 20%), temperatura (22°C, \pm 3°C) e ciclo de luz 12h claro/12h escuro. Foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum*.

O alojamento e manejo dos animais seguiram a Lei N° 11.794, de 8 de outubro de 2008 e o Decreto N° 6.899, de 15 de julho de 2009, e os princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1996). Foram observadas também as orientações da Resolução N° 1.000, de 11 de maio de 2012, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFVM, 2012) e resoluções normativas do CONCEA.

Todos os procedimentos utilizando animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRGS, Porto Alegre, RS, número 29477 (mestrado de Lais Hartmann Jardim, junto ao PPGFT-UFRGS).

3.2.2 Delineamento experimental

Utilizou-se três doses espaçadas geometricamente, conforme recomendado por ANVISA, OECD, FDA, sendo a menor dose 0,01g%, a dose que contém a quantidade de boldina presente em 40g de folhas de *Peumus boldus*, quantidade aconselhada para tratamento de náuseas (SPETHMANN, 2003). Todos os animais foram tratados diariamente, por via oral, através de sonda gástrica flexível em volume correspondente a 10 ml/kg, sendo idêntico em todos os grupos. A diferença ocorreu na concentração de boldina na solução administrada que foi de 0,01%, 0,1% e 1%. Dessa forma, dividiram-se os grupos da seguinte maneira:

GRUPO I. Controle negativo - tratado com salina 0,9% (NaCl 0,9%) – CN

GRUPO II. Dose 1 - tratado com boldina, na concentração de 0,01g% – 1BD

GRUPO III. Dose 2 - tratado com boldina, na concentração de 0,1g% – 10BD

GRUPO IV. Dose 3 - tratado com boldina, na concentração de 1,0g% – 100BD

Após o período de adaptação de 7 dias, os animais foram divididos nos 4 grupos descritos, cada um composto por 60 fêmeas e 20 machos. Os machos não foram tratados. As fêmeas foram tratadas a partir do 1º dia de gestação até o dia do nascimento da progênie.

Após a puberdade e maturidade sexual da progênie, observada através da avaliação de parâmetros como descida de testículos, separação prepucial e abertura do canal vaginal, os animais com idade a partir dos 100 dias e não consanguíneos constituíram aleatoriamente casais, cujo comportamento sexual foi avaliado.

3.2.3 Comportamento sexual

O grupo controle foi composto por onze, o 1BD por catorze, o 10BD por nove e o 100BD por dez casais não consanguíneos escolhidos aleatoriamente. Para avaliação do comportamento sexual as fêmeas foram examinadas diariamente, durante o ciclo escuro, quanto à fase do ciclo estral mediante análise de citologia vaginal, a fim de selecionarem-se as fêmeas no período de estro para o acasalamento.

Para a avaliação do comportamento sexual, cada macho foi retirado de sua gaiola moradia e colocado individualmente na caixa de observação acrílica (50 cm³), por um período de 30 minutos para adaptação. A iluminação foi realizada por meio da utilização de lâmpada vermelha de 15 W. Logo após, a fêmea foi introduzida dando início a observação do comportamento

sexual, por 30 minutos. O teste realizado foi registrado usando câmera de vídeo digital e analisado através do software Behavsoft® (patente pendente). Este programa proporciona uma análise precisa do comportamento em tempos selecionados pelo usuário, através de uma interface única usando comandos de atalho do teclado (COSTA *et al.*, 2015).

A figura 1 mostra as características de comportamento sexual masculinas (A, B, C, D e E) e femininas (F) analisadas durante o acasalamento. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Latência para primeira monta (LPM): tempo transcorrido desde a introdução da fêmea na caixa de observação até a primeira monta com ou sem intromissão vaginal.

- Latência para primeira intromissão (PLI): tempo transcorrido desde a introdução da fêmea na caixa de observação até a primeira monta com intromissão vaginal.

- Número de montas incompletas (MI): montas sem intromissão do pênis na vagina da fêmea, até a primeira ejaculação.

- Números de intromissões (NI): montas com intromissão vaginal até a primeira ejaculação, incluindo a intromissão ejaculatória.

- Latência para ejaculação (LPE): intervalo entre a primeira intromissão e a primeira ejaculação (considera-se ejaculação a monta com duração superior a dois segundos, lordose da fêmea presente, levantar e balouçar do tronco pelo macho, seguida de ausência de interesse sexual nos minutos seguintes).

- Latência para primeira monta pós-ejaculação (LPMP): tempo transcorrido desde a primeira ejaculação até a primeira monta.

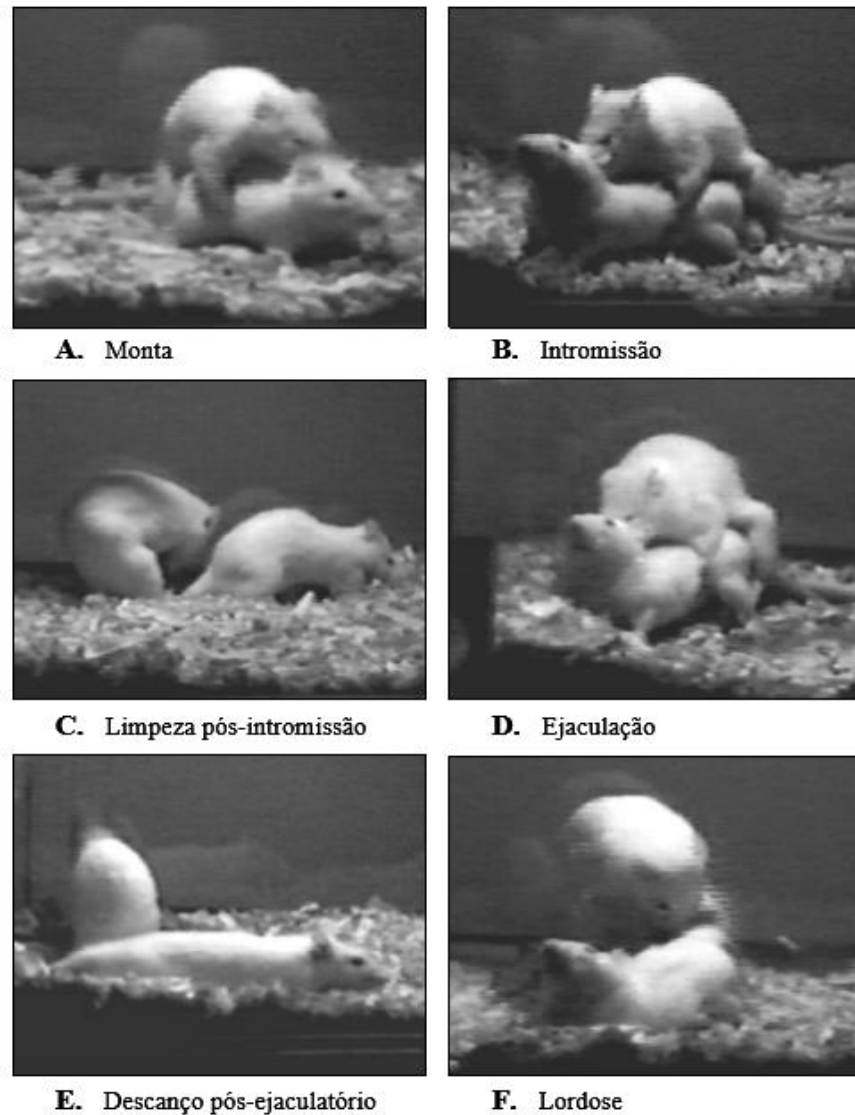
- Latência para primeira intromissão pós-ejaculação (LPIP): tempo transcorrido desde a primeira ejaculação até a primeira intromissão.

- Número de montas incompletas pós-ejaculação (MIP): idêntico a MI desde a primeira ejaculação até o final do tempo de observação.

- Número total de intromissões pós-ejaculação (NIP): idêntico a NI desde a primeira ejaculação até o final do tempo de observação, incluindo intromissões ejaculatórias.

- Número total de ejaculações (NE): número de ejaculações realizadas pelo animal no tempo total de observação.

Figura 3. Características de comportamento sexual de machos e fêmeas adultos observados durante a análise do acasalamento.



Fonte: DALLEGRAVE, 2003

Posteriormente, foi realizada análise por citologia vaginal, quanto à presença de espermatozoides, e/ou observação da presença de tampão vaginal, sendo as fêmeas copuladas consideradas gestantes e realocadas para caixas individuais. Foi oportunizada uma nova tentativa aos casais onde a fêmea não manifestou evidências de cópula.

3.2.4 Análise estatística

Foi empregado o software GraphPad Prism v 7.03 (GraphPad, 2017) para a realização da análise estatística. As variáveis em questão passaram pelas seguintes análises:

- Teste de Shapiro-Wilk para avaliação de normalidade;
- Teste qui-quadrado para variáveis quantitativas;
- Análise de variância de uma via (ANOVA) para amostras paramétricas seguida do teste de múltiplas comparações de Turkey-Kramer para avaliar possíveis diferenças entre os grupos;
- Teste Kruskal-Wallis seguido de teste de múltiplas comparações de Dunn para amostras não paramétricas.

O nível de significância admitido para rejeitar a hipótese de nulidade foi de uma probabilidade de 5% ($p < 0,05$) em todas as análises empregadas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de plantas para fins medicinais, como tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática médica da humanidade, sobretudo quando o objetivo do uso se estabelece para o tratamento de perturbações digestivas (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Nessa linha, preparações fitoterápicas contendo um variável número de plantas vem sendo empregadas decorrente de preconizados efeitos sobre a cinética e secreção digestivas (MELLO; MELLO; LANGELOH, 2008). Ao se reconhecer os benefícios da utilização de fitoterápicos não devemos deixar de lado os cuidados com as possíveis reações adversas e a toxicidade das preparações (MELLO; MELLO; LANGELOH, 2009).

A exposição maternal à xenobióticos durante o período gestacional pode causar neurotoxicidade no desenvolvimento e/ou anormalidades comportamentais nos descendentes (CASTRO; PALERMO-NETO, 1988; CASTRO *et al.*, 1992). De acordo com os mesmos autores, alterações no sistema nervoso causadas por exposição maternal são passíveis de ocorrer até mesmo na vida adulta, e as avaliações comportamentais são capazes de demonstrar tais modificações.

Os estudos de toxicidade pré-clínica necessitam indicar o grau de confiança a se depositar em determinado medicamento com vistas à administração em seres humanos (MELLO; LANGELOH; MELLO, 2007) e animais. Tais estudos devem ser realizados com base em protocolos aceitos internacionalmente. No Brasil a legislação que regulamenta a realização de testes pré-clínicos de toxicidade para medicamentos fitoterápicos é a Resolução N° 90 de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil (ANVISA, 2004). É estipulado que testes de avaliação de risco sejam realizados em duas espécies de mamíferos, uma roedora e uma não roedora, machos e fêmeas de linhagem isogênica, em número suficiente para que haja garantia das análises estatísticas dos resultados, sem excessos que violem os “Princípios Éticos da Experimentação Animal” (COBEA, 1996). Também estipula a via de administração a ser utilizada, doses e duração do tratamento, tendo como base os recomendados para uso do fitoterápico em humanos.

Foi realizada a observação de parâmetros de latência para 1ª monta (LPM), latência para 1ª intromissão (LPI), latência para ejaculação (LPE), latência para 1ª monta pós-ejaculação (LPMP) e latência para 1ª intromissão pós-ejaculação (LPIP). Ainda foram avaliadas a

porcentagem de animais que ejacularam, o número de montas incompletas e intromissões até a primeira ejaculação, de montas incompletas e intromissões pós-ejaculação, e o número total de ejaculações. Além da porcentagem de fêmeas que apresentaram comportamento de aceitação do macho (lordose).

O presente estudo é parte de um experimento maior que objetivou avaliar os efeitos do alcaloide boldina sobre fêmeas tratadas durante o período gestacional e suas variáveis comportamentais e toxicológicas (Segmento I), e seus efeitos sobre o desenvolvimento da progênie exposta durante as fases de desenvolvimento fetal (Segmento III).

A Tabela 1 mostra os resultados referentes às latências obtidas de proles tratadas com o alcaloide boldina via útero durante o período de desenvolvimento fetal.

Tabela 1. Parâmetros de latência de machos inexperientes expostos via útero a solução salina 0,9% (CN), 0,01% de Boldina (1BD), 0,1% de Boldina (10BD) e 1% de Boldina (100BD). Os dados estão expressos em média \pm EPM. N = número de animais.

Comportamento sexual	Grupos			
	CN (N=11)	1BD (N=14)	10BD (N=9)	100BD (N=10)
Latência para 1ª monta (s)	63,73 \pm 15,04	64,14 \pm 9,889	80,22 \pm 11,15	69,5 \pm 22,88
Latência para 1ª intromissão (s)	65,1 \pm 16,47	69,77 \pm 10,66	101,0 \pm 31,45	79,7 \pm 22,76
Latência para ejaculação (s)	1019 \pm 163,2	1025 \pm 98,97	920,6 \pm 136,3	829 \pm 56,07
Latência para 1ª monta pós-ejaculação (s)	201,4 \pm 12,7	238,1 \pm 21,48	227,0 \pm 4,313	212,7 \pm 21,7
Latência para 1ª intromissão pós-ejaculação (s)	202,4 \pm 13,23	241,9 \pm 20,84	227,8 \pm 4,757	213,2 \pm 21,75

Fonte: O próprio autor.
p > 0,05, Kruskal-Wallis.

Na Tabela 2 estão relacionados os parâmetros totais dos números de montas incompletas e intromissões pré e pós-ejaculação e número de ejaculações de proles tratadas com o alcaloide boldina via útero durante o período de desenvolvimento fetal.

Tabela 2. Parâmetros totais de número de montas incompletas e intromissões pré e pós-ejaculação, e número de ejaculações de machos inexperientes expostos via útero a solução salina 0,9% (CN), 0,01% de Boldina (1BD), 0,1% de Boldina (10BD) e 1% de Boldina (100BD). Os dados estão expressos em média \pm EPM. N = número de animais.

Comportamento sexual	Grupos			
	CN (N=11)	1BD (N=14)	10BD (N=9)	100BD (N=10)
Animais que ejacularam (%)	54,54	57,14	77,77	60,00
Nº de montas incompletas*	26,45 \pm 3,711	18,79 \pm 3,589	19,78 \pm 2,425	22 \pm 3,515
Nº de intromissões*	33,09 \pm 6,906	42,14 \pm 7,025	30,33 \pm 7,869	36,2 \pm 4,962
Nº de montas incompletas pós-ejaculação	5,545 \pm 2,567	6 \pm 2,216	6,778 \pm 2,259	5,5 \pm 2,062
Nº de intromissões pós-ejaculação	6,818 \pm 2,796	7,857 \pm 2,707	11,11 \pm 3,413	11,4 \pm 3,42
Nº total de ejaculações	1,091 \pm 0,3682	1,00 \pm 0,2774	1,556 \pm 0,412	1,00 \pm 0,3333

Fonte: O próprio autor.

p > 0,05, ANOVA* para amostras paramétricas e Kruskal-Wallis para amostras não paramétricas.

Há registro de efeitos adversos demonstrados pelo alcaloide boldina. Alterações anatômicas e nos blastocistos e certa atividade abortiva quando administrado extratos de boldo (*Peumus boldus*) e boldina durante a gestação, foram observados por Almeida *et al.* (2000). Alterações também foram encontradas em um estudo recente realizado por Jardim (2017), utilizando-se fêmeas tratadas com boldina em doses de 1mg/kg, 10mg/kg e 100mg/kg para avaliação de potenciais efeitos tóxicos. Que demonstrou que a administração durante o período gestacional provavelmente interfere na implantação embrionária, aumentando as perdas pré-implantação e interferindo também com os conceitos após este período. O experimento também demonstrou que o comportamento materno de fêmeas tratadas apresentou alterações, e alterações no comportamento materno podem modificar a resposta da prole a diversos estímulos e comportamentos e por isso torna-se uma variável de grande importância para o desenvolvimento reprodutivo da prole (JARDIM, 2017).

Em linha com as últimas observações, o mesmo estudo encontrou alterações em característica físicas e sexuais das proles expostas via útero a boldina. O tratamento acarretou em desenvolvimento precoce dos testículos, separação prematura do prepúcio e abertura precoce do canal vaginal, além de abertura antecipada dos olhos. Sugerindo que o alcaloide quando administrado no período gestacional, interfere em reflexos nos primeiros dias de vida da prole. Também foram encontradas alterações no peso de órgãos como rim e fígado de machos e fêmeas,

próstata de machos e ovários de fêmeas dos grupos expostos a boldina. A avaliação da morfologia e produção de espermatozoides apresentou alterações significativas no grupo exposto a maior dose do alcaloide, indicando que o tratamento das fêmeas gera alterações reprodutivas na prole púbere (JARDIM, 2017).

Os resultados obtidos no presente estudo para LPM, LPI, LPE, LPMP e LPIP não apresentaram alterações significativas quando comparados com o controle e entre si. O mesmo ocorreu nos resultados referentes a Tabela 2, onde em nenhuma variável foi encontrada alteração significativa. Contudo, pode-se perceber que o grupo tratado com 0,1% apresentou um aumento nos parâmetros de LPM e LPI, sugerindo uma certa diminuição na motivação sexual ou libido dos machos. O mesmo grupo demonstrou uma elevada porcentagem de animais que ejacularam e uma certa diminuição no número de intromissões até a primeira ejaculação quando comparado aos demais grupos, sugerindo um aumento do desempenho sexual. Isso indica que, ainda que a motivação e o desempenho sexual estejam intimamente relacionados, os mesmos possuem certa distinção entre si.

Foi possível observar, também, uma diminuição na LPE no grupo tratado com 1,0% de boldina, o que indica uma facilidade de ativação de reflexos ejaculatórios, contudo, não foi considerada significativa estatisticamente.

Tendo em vista a potencial ação como antagonista dopaminérgico do alcaloide boldina e levando em consideração que muitos dados na literatura (HULL *et al.* 1984; HULL *et al.*, 1986; PEHEK; THOMPSON; HULL, 1989; WARNER *et al.*, 1991; HULL, 1995; HULL *et al.*, 1997; BRIONI; MORELAND, 2006) apontam o papel da dopamina como sendo de grande importância na expressão do comportamento sexual, esperava-se que o mesmo poderia reduzir significativamente a motivação sexual e prejudicar os reflexos genitais. Contudo, o presente estudo não comprovou estatisticamente correlação entre a administração durante o período gestacional e efeitos comportamentais na progênie.

Por se tratar de um antagonista α 2-adrenérgico, poderia se considerar que o alcaloide boldina exerceria um efeito estimulante sobre o comportamento sexual da progênie, levando em conta que estudos mostraram que antagonistas destes receptores aumentam a intensidade do comportamento de cópula, através da redução da LPM, LPI e LPE e aumento na porcentagem de animais que ejaculam (PETERS *et al.*, 1988; BENELLI *et al.*, 1993). Porém, no presente estudo, não foi possível observar diferenças significantes que pudessem relacionar este fator com a exposição via útero a boldina. A diferença nos resultados obtidos no presente experimento com

relação aos estudos citados se deve ao fato de, tanto o estudo dirigido por Peters *et al.* (1988) quanto o estudo de Benelli *et al.* (1993), terem sido realizados com animais já em idade púbere ou adulta, em nenhum dos dois casos foram estudados os efeitos nas proles de fêmeas tratadas com antagonistas $\alpha 2$ -adrenérgicos.

No grupo controle (CN) 73% das fêmeas apresentaram comportamento de lordose, já no grupo 1BD este valor subiu para 93%. Nos grupos 10BD e 100BD 78% e 90%, respectivamente, demonstraram comportamento de aceitação do macho, porém, em nenhum dos grupos houve diferença significativa.

Sendo o alcaloide boldina inibidor competitivo de receptores 5-HT₃ humano (WALSTAB *et al.*, 2014), e em linha com os resultados obtidos por Maswood *et al.* (1997), onde foi observado uma inibição do comportamento de lordose, poderia supor-se que o mesmo age de forma negativa sobre o comportamento sexual das fêmeas. Entretanto, os resultados referentes ao comportamento de lordose no presente estudo não obtiveram diferença estatística significativa. Os resultados obtidos no experimento de Maswood *et al.* (1997) apresentam tal distinção com os resultados encontrados no presente estudo devido ao fato de ter sido realizado com fêmeas em idade púbere e não com a prole de mães tratadas durante o período gestacional, e também devido a diferença na metodologia aplicada pelo autor para avaliar as lordoses.

Embora o número mínimo para experimentos dessa natureza referido na literatura seja o utilizado no nosso trabalho, devido à uma tendência de alteração observada em alguns parâmetros, principalmente no grupo 10BD, é possível que a ampliação amostral fosse capaz de relacionar diferenças estatisticamente significativas. Se, mesmo com o aumento das amostras, os resultados se mantiverem os mesmos, uma possível explicação para não ocorrer diferença entre os grupos tratados e o controle seria o acesso, aparentemente fraco, ao menos em algumas regiões do sistema nervoso central, do alcaloide boldina (ASENCIO *et al.*, 1998), somado à sua meia-vida plasmática muito curta (31 minutos) (JIMENEZ; SPEISKY, 2000), que não permitem que algumas propriedades sejam facilmente reveladas em alguns experimentos *in vivo* (ASENCIO *et al.*, 1998).

5 CONCLUSÃO

Considerando que não foram observadas alterações relevantes nos diversos parâmetros investigados, não há entre os resultados obtidos no presente estudo, indicações de que o alcaloide boldina possa causar efeitos tóxicos sobre o comportamento sexual de ninhadas quando administrado em doses repetidas em ratas Wistar tratadas durante a gestação (21 dias). Os dados indicam que a concentração do alcaloide está abaixo da registrada na literatura como potencialmente capaz de desencadear efeitos tóxicos.

REFERÊNCIAS

- ÅGMO, A. Male rat sexual behavior. **Brain research protocols**, v. 1, n. 2, p. 203–209, maio 1997.
- ALMEIDA, F.C.G.; LEMONICA, I.P. The toxicity of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **J Ethnopharmacol.** v.73, n.1-2, p.53-60, 2000.
- ALMEIDA, K.S.; FREITAS, F.L.C. Etnoveterinária: a fitoterapia na visão do futuro profissional veterinário. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v.1, n.1, p. 67-74, jan./jun. 2006.
- AMERICAN BOTANICAL COUNCIL.** The Complete German Commission E Monographs, Texas, 1998.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia Para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos. RESOLUÇÃO - RE Nº 90, DE 16 DE MARÇO DE 2004.
- BENELLI, A.; ARLETTI, R.; BASAGLIA, R.; BERTOLINI, A. Male sexual behaviour: Further studies on the role of alpha 2-adrenoceptors. **Pharmacological Research**, Modena, v.28, n.1, p.35-45, fev. 1993
- BISSET, N.G.; WICHTL, M. **Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals.** CRC Press, Stuttgart, 1994.
- BITRAN, D.; HULL, E. M. Pharmacological analysis of male rat sexual behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 11, n. 4, p. 365–389, mar. 1987.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **ANVISA.** Portaria 116, de 08 de agosto de 1996. Diário Oficial da União, 12.08.1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **ANVISA.** Portaria 48, de 16 de março de 2004. Diário Oficial da União, 18.03.2004.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto 5.053 de 22 de abril de 2004. Aprova o Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabriquem ou Comerciem, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] União**, Brasília DF, 22 de abril de 2004. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d5053.htm>. Acesso em: 01 dez. 2017.
- BRIONI, J.D.; MORELAND, R.B. Dopamine D4 receptors and the regulation of penile erection. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, Abbott Park, v. 3, n. 4, p. 599–604, 2006.
- BRUN, P. **Précis de Matière Médicale.** G. Doin Ed., Paris, 1936.
- BRUNETON, J. **Farmacognosi.** 2 ed., Ed. Acribia, Zaragoza, 2001.
- CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. **Procedimentos e Métodos de Eutanásia em Animais**, Brasília, Resolução Nº1.000, de 11 de maio de 2012.

CASTRO, V.L.; PALERMO-NETO, J. Alterations in the behavior of young and adult rats exposed to aldrin during lactation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.21, p. 987-990, 1988.

CASTRO, V.L.; BERNARDI, M.M.; PALERO-NETO, J. Evaluation of prenatal aldrin intoxication in rats. **Archives of Toxicology**. v.66, p.149-152, 1992.

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2a. Ed. São Paulo: H.A. Rothschild, 1996. 259p.

COIMBRA, R.; SILVA, E.D. **Notas de Fitoterapia**, 2 ed., Lab. Clínico Silva Araújo, Rio de Janeiro, 1958.

COSTA, P.A.; POLI, J.H.Z.; SPEROTTO, N.D.M.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; NIN, M.S.; BARROS, H.M.T. Brain DNA damage and behavioral changes after repeated intermittent acute ethanol withdrawal by young rats. **Psychopharmacology**. v. 232, p.3623-3636, 2015.

DALLEGRAVE, E. Toxicidade reprodutiva do herbicida Glifosfato-Roundup® em ratos Wistar. 2003. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

DE LA HERAS, B.; RIOS, J.L.; MARTINEZ-MIR, I.; RUBIO, E. A study of the adrenergic activity of the alkaloids boldine and glaucine. *Pharmazie* v.45, p.443-4, 1990

DUKE, J.A. **The Green Pharmacy Herbal Handbook**. Rodale Press, New York, 2000.

EBISUI, L.; FONTES, R.S.; LAPCHIK, V.B.V. Rato. In: **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. (orgs). São Paulo: Ed. Atheneu, 2009. p. 229 – 250.

ELTZE, Manfred et al. Affinity profile at α 1- and α 2-adrenoceptor subtypes and in vitro cardiovascular actions of (+)-boldine. **European Journal of Pharmacology**, Konstanz, v. 443, n. 1–3, p. 151–168, mar. 2002.

ESCOPE. MONOGRAPHS on the medicinal uses of plant drugs. **European Scientific Cooperative on Phytotherapy – ESCOP**, 1997.

FABEIRO, P., ALVAREZ, E., PINA, R., ORALLO, F. Comparative study of the in vivo and in vitro α 1- and α 2-adrenergic receptor blocking activity of (+)-boldine in normotensive rats. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol*, v.22, p.517, 2000.

GRAPHPAD PRISM. v. 7.03 for Windows, copyright GraphPad Software. Califórnia, fev. 2017.

GIORDANI, C.; MATOS, C.B.; GUTERRES, K.A.; SILVA, C.C.; SANTIN, R.; SCHUCH, L.F.D.; CLEFF, M.B. Plantas com potencial medicinal e tóxico em comunidade atendida pelo Ambulatório Veterinário-UFPel. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 3-4, p. 126-132, jul./dez. 2016.

GOTTELAND, M.J. et al. Effect of a dry boldo extract on oro-cecal intestinal transit in healthy volunteers, **Rev. Med. Chil**. 123 (1995) 955–960.

- GUPTA, M.P. 270 Plantas medicinales Iberoamericanas. **CYTED – SECAB**, Santafé de Bogotá, 1995.
- HÉRAIL, J. Traité de matière médicale – Pharmacographie. **Libr. J. B. Baillière et Fils**, Paris, 1927.
- HOFFMANN, A. **Oecologia Plantarum**, v.2, n.16, p.31-9, 1981.
- HULL, E.M.; NISHITA, J.K.; BITRAN, D.; DALTERIO, S. Perinatal dopamine-related drugs demasculinize rats. **Science**, v.224, p. 1011-1013, jun. 1984
- HULL, E.M; BITRAN, D.; PEHEK, E.A.; WARNER, R.K.; BAND, L.C.; HOLMES, G.M. Dopaminergic control of male sex behavior in rats: Effects of an intracerebrally-infused agonist. **Brain Research**, Buffalo, v. 370, n. 1, p. 73–81, ago. 1986
- HULL, E.M. Dopaminergic influences on male rat sexual behavior. In: **Neurobiological effects of sex steroid hormones**. MICEVYCH, P.E.; HAMMER, R.P. (Eds.). Cambridge: Cambridge Univ. Press; p.234–253, 1995.
- HULL, E.M.; DU, J.; LORRAIN, D.S.; MATUSZEWICH, L. Testosterone, preoptic dopamine, and copulation in male rats. **Brain Research Bulletin**, Buffalo, v. 44, n. 4, p. 327–333, 1997
- HULL, E. M.; WOOD, R. I.; MCKENNA, K. E. Neurobiology of male sexual behavior. In: **Physiology of Reproduction**. J. D. Neill (Ed.). New York: Elsevier, cap. 33, p. 1730-1824, 2006.
- IVORRA, M.D.; CHULIÁ, S.; LUGNIER, C.; D'OCÓN, M.P. Selective action Showed by two aporphines at alphaadrenergic receptors and in the potential-operated calcium Channel. **Eur. J. Pharmacol.**, v.231, p.165-74, 1993.
- JARDIM, L.H. Avaliação da administração do alcaloide boldine em ratas Wistar durante o período gestacional sobre variáveis reprodutivas e comportamentais. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.
- JIMÉNEZ, I.; SPEISKY, H. Biological disposition of boldine: in vitro and in vivo studies. **Phytother. Res**, v.14 p.254-60, 2000.
- LEMONICA, I.; SANSEVERINO, M.; SPRITZER, D.; SCHÜLER-FACCINI, L. **Teratogênese experimental e sua aplicação em humanos**. Manual de teratogênese. Porto Alegre: UFRGS: 19-39, 2001.
- LIMA, R.P.; PALITOT, K.M.; REGO, M.A.E.; XAVIER, F.J.R.; SOUZA, A.E.F. Emprego de plantas medicinais em animais de companhia e de produção da zona rural do município de Juru-PB. **Revista de Biologia e Farmácia**, Campina Grande, v.8, n. 1, p. 85-92, ago. 2012.
- MAS, M. Neurobiological correlates of masculine sexual behavior. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Tenerife, v. 19, n. 2, p. 261–277, 1995
- MASWOOD, N.; CALDAROLA-PASTUSZKA, M.; UPHOUSE, L. 5-HT3 receptors in the ventromedial nucleus of the hypothalamus and female sexual behavior. **Brain Research**, Denton, v. 769, n. 1, p. 13–20, maio 1997.

- MELLO, F.B.; LANGELOH, A.; MELLO, J.R.B. Toxicidade pré-clínica de fitoterápico contendo *Passiflora alata*, *Erythrina mulungu*, *Leptolobium elegans* e *Adonis vernalis*. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires , v. 26, n. 2, p. 191–200, 2007.
- MELLO, J.R.B.; MELLO, F.B.; LANGELOH, A. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Aloe ferox*, *Quassia amara*, *Cynara scolymus*, *Gentiana lutea*, *Peumus boldus*, *Rhamnus purshiana*, *Solanum paniculatum* e *Valeriana officinalis*. **Lat. Am. J. Pharm.**, Porto Alegre, v.28, n.1, p.183-91, 2009
- MELLO, J.R.B.; MELLO, F.B.; LANGELOH, A. Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápico Contendo *Gentiana lutea*, *Rheum palmatum*, *Aloe ferox*, *Cynara scolymus*, *Atropa belladonna*, *Peumus boldus* e *Baccharis trimeraem* Coelho Nova Zelândia. **Lat. Am. J. Pharm.**, Porto Alegre, v.27, n.5, p.752-6, 2008
- MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais a gravidez. In: Anseverino ATV, Spreitzer DI, Schüler-Faccini L. **Manual de Teratogênese**. Porto Alegre: Editora da Universidade; p.422-50, 2001.
- MEISEL, R. L.; SACHS, B. D. The physiology of male sexual behavior. In: KNOBILL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. 2. Ed. New York: Raven Press, 1994. v. 2, cap. 35, p. 3-105.
- NEWALL, C.A.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. **Plantas Mediciniais. Guia para o Profissional da Saúde**. Editorial Premier, São Paulo, 2002.
- O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, n. 1, p. 1-17, out. 2006.
- OECD Guideline for the Testing of Chemicals 416, TwoGeneration Reproduction Toxicity Study, 2001.
- OLIVIER, J.D.A.; JONG, T.R.; DEDEREN, P.J.; VAN OORSCHOT, R.; HEEREN, D.; PATTIJ, T.; WALDINGER, M.D.; COOLEN, L.M.; COOLS, A.R.; OLIVIER, B.; VEENING, J.G. Effects of acute and chronic apomorphine on sex behavior and copulation-induced neural activation in the male rat. **European Journal of Pharmacology**, Utrecht, v. 576, n. 1–3, p. 61–76, ago. 2007.
- PARIS, R.R.; MOYSE, H. **Précis de Matière Médicale**, Tome II, Masson Ed., Paris, 1967.
- PEHEK, E.A.; THOMPSON, J.T.; HULL, E.M. The effects of intracranial administration of the dopamine agonist apomorphine on penile reflexes and seminal emission in the rat. **Brain Research**, Amherst, v. 500, n. 1–2, p. 325–332, mar. 1989.
- PETERS, R. H.; KOCH, P. C.; BLYTHE, B. L. Differential effects of yohimbine and naloxone on copulatory behavior of male rats. **Behavioral Neuroscience**, Iowa, v. 102, n. 4, p. 559–564, 1988.
- PFAUS, J. G.; MENDELSON, S. D.; PHILLIPS, A. G. A correlational and factor analysis of anticipatory and consummatory measures of sexual behavior in the male rat. **Psychoneuroendocrinology**, v. 15, n. 5–6, p. 329–340, jun. 1990.

PFAUS, J.G.; EVERITT, B.J. The psychopharmacology of sexual behavior. In: BLOM, R. E.; KUPFER, D.J. (Eds). *Psychopharmacology: the fourth generation of progress*. **New York Raven Press**, p. 743-58. 1995

PLANCHON, L.; BRETIN, P; MANCEAU, P. **Précis de Matière Médicale**, Tome I, 5 ed., Libr. Maloine, Paris, 1946.

PDR for herbal Medicines. 2 ed., **Medical Economics Company**, New Jersey, 2000.

QUEZADA, M., et al. Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from boldo (*Peumus boldus* Molina) leaves, **J. Food Sci.** 69 (2004) 371–376.

ROBBINS, Trevor W.; EVERITT, Barry J. Functions of dopamine in the dorsal and ventral striatum. **Seminars in Neuroscience**, Cambridge, v. 4, n. 2, p. 119–127, 1992.

RODRIGUES-ALVES, P. S. B. Interferência da Moxidectina na motivação sexual e ereção peniana de ratos: envolvimento de neurotransmissores hipotalâmicos e estriatais. 2007. Dissertação (Doutorado em Psicologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SANTOS, L. D. Avaliação da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. em ratos wistar. 2017. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

SIGMA-ALDRICH. Copyright Sigma-Aldrich. Merck KGaA, Darmstadt, Germany, 2017.

SILVA, J.; FONSECA, M.B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424p.

SOUSA, F.C.; OLIVEIRA, E.N.A.; SANTOS, D.C.; OLIVEIRA, F.A.A.; MORI, E. Uso de plantas medicinais (fitoterápicos) por mulheres da cidade de Icó-CE. **Revista de Biologia e Farmácia**, Campina Grande, v. 5, n. 1, p. 161-170. 2011

SPEISKY, H.; CASSELS, B. K. **Pharmacol. Res.** 29: 1-11, 1994.

SPETHMANN, C.N. **Medicina Alternativa de A a Z**. Ed. Natureza. 2003

URZÚA, A.; ACUÑA, P. *Fitoterapia*, 54: 175-7, 1983.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, fev. 2005.

VIITAMAA, T.; HAAPALINNA, A.; ÅGMO, A. The adrenergic α_2 receptor and sexual incentive motivation in male rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Turku, v. 83, n. 3, p. 360–369, mar. 2006.

WALSTAB, J.; WOHLFARTH, C.; HOVIUS, R.; SCHMITTECKERT, S.; OTH, R.R.; LASITSCHKA, F.; WINK, M.; ONISCH, H. B.; NIESLER, B. Natural compounds boldine and menthol are antagonists of human 5-HT₃ receptors: implications for treating gastrointestinal disorders. **Neurogastroenterol Motil**, Heidelberg, v.26, p.810–820, fev. 2014

WARNER, R.K.; THOMPSON, J.T.; MARKOWSKI, V.P.; LOUCKS, J.A.; BAZZETT, T.J.; EATON, R.C.; HULL, E.M. Microinjection of the dopamine antagonist cis-flupenthixol into

the MPOA impairs copulation, penile reflexes and sexual motivation in male rats. **Brain Research**, Amherst, v. 540, n. 1–2, p. 177–182, ago. 1991.

WEBER, D. N. Mechanisms of Behavioral Toxicology: An Integrated Approach. **American Zoologist**, v. 37, p. 343–345, nov. 1997.

WHO. **Organización Mundial de la Salud Ginebra**. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional. 2005.

ZETLER, G. Neuropeptide-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of apomorphine alkaloids:bulbocapnine, corutuberine, boldine and glaucine **Arch. Int. Pharmacod. Ther.** 296: 255-81, 1988.