

NEILA AUGUSTA ALVES DA SILVA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATO ALCOÓLICO DAS  
DIFERENTES PARTES DA MELANCIA (*Citrullus lanatus* (THUNB.)  
MATSUM. & NAKAI.) E DA L-CITRULINA SOBRE OS TESTÍCULOS  
DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS ADULTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S586e  
2017  
Silva, Neila Augusta Alves da, 1965-  
Efeito da suplementação com extrato alcoólico das  
diferentes partes da melancia (*Citrullus lanatus* (THUNB.)  
MATSUM.& NAKAI.) e da L-citrulina sobre os testículos de  
camundongos suíços adultos / Neila Augusta Alves da Silva. –  
Viçosa, MG, 2017.  
xii, 39f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Melancia. 2. L-citrulina. 3. Testosterona. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa  
de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

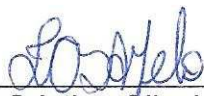
CDD 22 ed. 635.615

NEILA AUGUSTA ALVES DA SILVA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATO ALCOÓLICO DAS  
DIFERENTES PARTES DA MELANCIA (*Citrullus lanatus* (THUNB.)  
MATSUM. & NAKAI.) E DA L-CITRULINA SOBRE OS TESTÍCULOS  
DE CAMUNDONGOS SUÍÇOS ADULTOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 03 de julho de 2017.



Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo



João Bosco Gonçalves de Barros



Sérgio Luis Pinto da Matta  
(Orientador)

**Aos meus filhos Ian e Enzo**

Pelo amor e pelo carinho

**Aos fiéis companheiros**

Pelo apoio e pela companhia

**“With A Little Help From My Friends”**

**(John Lennon/Paul McCartney)**

## Agradeco

Ao meu orientador, professor Sérgio Luis Pinto da Matta, pois sem ele nada disso seria possível. Grande Mestre e Pai, sempre o carregarei em meu coração!

Aos meus filhos, fãs incondicionais da mãe, que gentilmente me cederam para a UFV e sempre me apoiaram.

À minha mãe e minha irmã, apoio fundamental para a realização deste trabalho. Pelo carinho e atenção que sempre cuidaram de mim e dos meus filhos.

Aos meus entes queridos que partiram cedo demais. Onde quer que estejam, sempre me iluminam.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de pesquisa e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular pelo aporte financeiro.

Aos ex Presidentes do Brasil, Luíz Inácio Lula da Silva e Dilma Vana Rousseff, que ousaram acreditar que se pode construir um país melhor através da educação.

Aos animais, merecedores de nosso respeito e agradecimento, que cederam a vida neste experimento.

Aos colegas do programa de pós-graduação, que muito contribuíram para a realização deste trabalho. Meu agradecimento à Janaína, Luizinho, Veronica e Viviane pela ajuda nos dados e especialmente Fernanda e Dudu, que sempre me arrancaram risos, tornando meus dias melhores e mais alegres.

Aos membros desta banca, por terem acrescentado ainda mais a este trabalho.

À professora e grande amiga Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo, que gentilmente se prontificou a me ajudar.

À professora Rosyane Cruzeiro, por me incentivar a mergulhar no maravilhoso mundo da histologia.

À professora Reggiani Vilela, pelo carinho, pela amizade e por acreditar em mim.

Aos professores do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, Izabel, Adílson, Juliana e Mariana, pelo apoio e pelos ensinamentos.

Ao Matheus, pela prestigiosa ajuda com os reagentes e pela beleza, que encanta nosso laboratório.

Aos funcionários da Biologia Celular e Estrutural, em especial Beth e Adriana, pelo carinho e atenção.

Aos funcionários da Biologia Geral, em especial o João Bosco, pelos elogios.

Aos professores João Marcos, pelo carinho e Eduardo Serrão, pela paciência.

Aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Geral e Biologia Animal.

Ao professor e grande camarada Jorge Dergan, que gentilmente cedeu o Laboratório de Sistemática Molecular, do Departamento de Biologia Animal, para a realização das fotos. Agradeço também aos funcionários e usuários deste Laboratório, pela gentileza ao compartilharem o espaço.

Ao professor Paulo César Stringheta, pelos ensinamentos, por me acompanhar na apresentação de trabalho e por gentilmente ter cedido o Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos. Agradeço também ao Valério e demais funcionários deste laboratório.

Ao professor Afonso Mota Ramos, pela contribuição e por gentilmente ter disponibilizado o setor de Processamento de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos da UFV, para o processamento da melancia. Aos queridos funcionários deste setor, que muito me ajudaram, sempre com um sorriso estampado no rosto e me oferecendo inúmeras coisas gostosas que acabavam de fabricar. Eles tornaram meus dias mais doces e melhores ainda que o doce de leite Viçosa.

Ao professor João Paulo Viana Leite, que gentilmente cedeu seu laboratório e equipamentos, onde foram feitos os extratos. Obrigada também à Letícia e demais usuários deste laboratório, pela prestigiosa ajuda.

À professora Marisa Nogueira e Viktor, pela ajuda nas análises fitoquímicas.

Ao professor Antonio José Natali, que gentilmente cedeu o Biotério para abrigar os animais. Agradeço também aos estudantes da Educação Física usuários deste espaço, especialmente ao Danillo Laviola.

Ao Hugo Genier, Fernando Augusto Silveira e Nívea, pela ajuda na quantificação do teor de L-citrulina nos extratos e ao professor Wendel Batista da Silveira, por gentilmente ter cedido o Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, do Departamento de Microbiologia.

Aos meus professores da Nutrição, que despertaram em mim a curiosidade científica e aos colegas do curso, que foram sempre grandes companheiros e incentivadores.

À querida Nathane Siqueira, pela ajuda.

Aos queridos Wendeo e Sabrina Emerick, por me darem morada e conforto em seus corações.

À Renata, que nunca deixou que nos faltasse gelo e nitrogênio.

Ao Geraldo, Pedro e Mariáurea, pela parceria nas aulas de Anatomia.

Ao grupo “Los Amigos” e “Confraria das Malditas”, por tornarem meus dias mais alegres.

Ao Edson Oride, cujos bombons adoçaram esta correção.

Ao Deus Baco e ao Bar do Marcelo, onde o conforto de uma cerveja gelada, boa música e excelentes companhias ampararam nos momentos ruins e abrilhantaram os bons momentos. Aos amigos, Sanele, Jaque Costa, Fernanda Amaral, Jaysa, Paulinho Correa, Yonara, Rita Márcia, Clara, Aida, Maria, Zé Carlos, Roseli, Laurinha e a todos que me acompanharam e apoiaram nesta jornada.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS .....	x
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
1 INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2 TESTICULO .....	2
2.1 Células de Leydig.....	3
2.2 Células de Sertoli .....	3
3 MELANCIA ( <i>Citrullus lanatus</i> ) .....	4
3.1 Origem e Caracterização .....	4
3.2 Produção de Melancia no Brasil.....	5
3.3 Composição Nutricional e Utilização .....	6
3.4 Uso Terapêutico .....	7
4 L-CITRULINA .....	9
5 OBJETIVOS .....	12
5.1 Objetivos Gerais.....	13
5.2 Objetivos Específicos.....	13
6 REFERÊNCIAS .....	14
7 ARTIGO: SUPLEMENTAÇÃO COM L-CITRULINA E EXTRATO ALCOÓLICO DOS DERIVADOS DE MELANCIA ( <i>Citrullus lanatus</i> ) INTERFERE NA ESPERMATOGÊNESE E NA SÍNTESE DE TESTOSTERONA EM CAMUNDONGOS ADULTOS.....	19
7.1 Resumo.....	19
7.2 Introdução .....	21
7.3 Material e Métodos.....	22
7.4 Resultados e Discussão .....	28
7.5 Conclusões .....	36
7.6 Referências .....	37

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Metabolismo da Citrulina	10
Figura 2	Concentrações de testosterona em animais controle e tratados com L-citrulina, citrato de sildenafila e diferentes concentrações de extrato de casca/entrecasca, polpa e semente de melancia.	35

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teor de sólidos solúveis (°Bx) presentes no fruto e no extrato de melancia.	28
Tabela 2	Biometrias, corporal e testicular, de animais controle e tratados com L-citrulina, citrato de sildenafil e diferentes concentrações de extratos de casca/entrecasca, polpa e semente de melancia.	30
Tabela 3	Densidade volumétrica (V/v) e volumetria dos túbulos seminíferos de animais controle e tratados com L-citrulina, citrato de sildenafil e diferentes concentrações de extratos de casca/entrecasca, polpa e semente de melancia.	31
Tabela 4	Diâmetro tubular, altura de epitélio e comprimento de túbulos seminíferos de animais controle e tratados com L-citrulina, citrato de sildenafil e diferentes concentrações de extratos de casca/entrecasca, polpa e semente de melancia.	34
Tabela 5	Áreas de túbulo, lume e epitélio, e relação túbulo-epitelial de animais controle e tratados com L-citrulina, citrato de sildenafil e diferentes concentrações de extratos de casca/entrecasca, polpa e semente de melancia.	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARE	Área Epitelial
ARG	Arginina
ARGase	Arginase
ARL	Área Luminal
ART	Área Tubular
ASL	Arginosuccinato Liase
ASS	Arginosuccinato Sintetase
AST	Aspartato Aminotransferase
CCl <sub>4</sub>	Tetracloroeto de Carbono
CIT	Citrulina
CT/g	Comprimento por grama de Testículo
CTT	Comprimento Total do Túbulo Seminífero
DCV	Doença Cardiovascular
DE	Disfunção Erétil
DP	Doença de Parkinson
DRC	Doença Renal Crônica
DVI	Densidade Volumétrica do Intertúbulo
DVT	Densidade Volumétrica do Túbulo Seminífero
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
GLN	Glutamina
GLNase	Glutaminase
GLU	Glutamato
IES	Índice Epitélio Somático
IGS	Índice Gonadossomático
ILS	Índice Leydigossomático
IPS	Índice Parenquimossomático
ITS	Índice Túbulossomático
NO	Óxido Nítrico
° BX	Grau Brix
OAT	Aminotransferase Ornitina
OCT	Ornitina Carmaboil Transferase
ORN	Ornitina
OTC	Ornitina Transcarbamilase
PA	Pressão Arterial
PC	Peso Corporal
PG	Peso das Gônadas
Ppar	Peso do Parênquima
REL	Retículo Endoplasmático Liso
RPM	Rotação Por Minuto
TB	Bilirrubina Total
UV	Ultravioleta
VE	Volume do Epitélio
VT	Volume Tubular

## LISTA DE SÍMBOLOS

G1	Grupo 1	Grupo não tratado – Recebeu água destilada
G2	Grupo 2	Grupo que recebeu o aminoácido L-citrulina, na dose de 30 mg/kg de peso corporal
G3	Grupo 3	Grupo que recebeu Citrato de Sildenafil, sendo a dose calculada em equivalência a um humano de 70kg de peso corporal
G4	Grupo 4	Grupo que recebeu extrato da casca/entrecasca com o equivalente de 30 mg do aminoácido L-citrulina por kg de peso corporal
G5	Grupo 5	Grupo que recebeu extrato da casca/entrecasca com o equivalente de 60 mg do aminoácido L-citrulina por kg de peso corporal
G6	Grupo 6	Grupo que recebeu extrato da polpa com o equivalente de 30 mg do aminoácido L-citrulina por kg de peso corporal
G7	Grupo 7	Grupo que recebeu extrato da polpa com o equivalente de 60 mg do aminoácido L-citrulina por kg de peso corporal
G8	Grupo 8	Grupo que recebeu 0,035 g de liofilizado do extrato da semente de melancia ressuspendido em água destilada

## RESUMO

SILVA, Neila Augusta Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Efeito da suplementação com extrato alcóolico das diferentes partes da melancia (*Citrullus lanatus* (THUNB.) MATSUM. & NAKAI.) e da L-citrulina sobre os testículos de camundongos suíços adultos.** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Alguns alimentos e determinados nutrientes têm sido associados com o sucesso reprodutivo dos animais ao longo da história. Entre estes, a melancia (*Citrullus lanatus*), uma fruta pertencente à família Cucurbitaceae, destaca-se por conter importantes componentes fitoquímicos, como o licopeno e a citrulina, sendo que a L-citrulina é um aminoácido isolado da melancia e tem papel na reprodução. Neste trabalho buscou-se avaliar os efeitos da suplementação com extratos de melancia e o aminoácido L-citrulina, sobre os parâmetros testiculares, através de análises morfométricas, estereológicas e hormonal, utilizando-se camundongos albinos Swiss adultos como modelo experimental. Foi feita a extração alcóolica de cada parte da melancia em separado, sendo este extrato submetido à quantificação do aminoácido L-citrulina. Utilizamos 80 camundongos Swiss adultos, com 230 dias de idade, divididos em 8 grupos. O grupo (G1) recebeu água destilada; o grupo (G2) recebeu o aminoácido L-citrulina, na dose de 30 mg/kg de peso corporal; o grupo (G3) recebeu Citrato de Sildenafil, na dose equivalente a um humano de 70kg de peso corporal; o grupo (G4) recebeu extrato da casca/entrecasca com o equivalente de 30 mg/kg de L-citrulina; o grupo (G5) recebeu extrato da casca/entrecasca com o equivalente de 60 mg/kg de L-citrulina; o grupo (G6) recebeu extrato da polpa com o equivalente de 30 mg/kg de L-citrulina; o grupo (G7) recebeu extrato da polpa com o equivalente de 60 mg/kg de L-citrulina e o grupo (G8) recebeu 0,035 g de liofilizado do extrato da semente de melancia ressuspensionado em água destilada. O volume diário que cada animal recebeu foi de 0,8mL, ministrados por gavagem, em dose única, durante 39 dias. Os grupos G4, G5, G6, G7, e G8 mostraram aumento no diâmetro do epitélio do túbulo seminífero em comparação com o grupo não tratado (G1) e também com os grupos G2 e G3. Foi observado em G7 aumento da altura do epitélio, sendo que nos demais grupos tratados as alturas do epitélio foram maiores, embora sem significância em relação ao grupo não tratado. O grupo G8 destacou-se dos demais na produção do hormônio testosterona. Os extratos promoveram aumento dos parâmetros como diâmetro de túbulo e altura do epitélio, bem como dos níveis de testosterona sérica. Houve ainda aumento das áreas tubular e epitelial, evidenciando incremento da espermatogênese.

## ABSTRACT

SILVA, Neila Augusta Alves, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Effect of supplementation with alcoholic extract of different parts of the watermelon (*Citrullus lanatus* (THUNB.) MATSUM. & NAKAI.) and L-citrulline on the adult Swiss mice testes.** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Nutrition has been associated with the reproductive success of animals throughout history. The watermelon (*Citrullus lanatus*) is a fruit belonging to the family Cucurbitaceae, being one of the cultivars more produced in the world and of great economic importance. Among the main phytochemical components of watermelon are lycopene and citrulline. L-citrulline is an amino acid isolated from watermelon and has a role in reproduction. The aim of this study was to evaluate the effects of supplementation with watermelon extracts on testicular parameters through morphometric, stereological and hormonal analyzes using adult Swiss albino mice as an experimental model. The alcoholic extraction of each part of the watermelon was done separately, being this extract subjected to the quantification of the amino acid L-citrulline. Were used 80 adult Swiss mice, with 230 days of age, divided into 8 groups. Group (G1) received only distilled water; The G2 group received the amino acid L-citrulline at a dose of 30 mg / kg body weight; The group (G3) received Sildenafil citrate, the dose being calculated in equivalence to a human of 70 kg body weight; Group (G4) received bark / ribs extract with the equivalent of 30 mg of the amino acid L-citrulline per kg body weight; The group (G5) received bark / ribs extract with the equivalent of 60 mg of the amino acid L-citrulline per kg of body weight; Group (G6) received pulp extract with the equivalent of 30 mg of the amino acid L-citrulline per kg of body weight; (G7) received pulp extract with the equivalent of 60 mg of the amino acid L-citrulline per kg of body weight and group (G8) received 0.035 g of lyophilized extract of the watermelon seed resuspended in distilled water. The daily volume that each animal received was 0.8 mL, given by gavage in a single dose for 39 days. Groups G4, G5, G6, G7, and G8 showed an increase in the diameter of the seminiferous tubule epithelium compared to the untreated group (G1) and also to the G2 and G3 groups. G7 increased the height of the epithelium, and in the other treated groups the epithelium heights were higher, although not statistically significant in relation to the untreated group. The watermelon extract promoted increased parameters such as tubule diameter and height of the epithelium, as well as serum testosterone levels. There was also an increase in epithelial area signaling increasing spermatogenesis.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A melancia é uma fruta apreciada no mundo inteiro, principalmente devido ao fato de ser nutritiva e de baixo valor calórico, possuir propriedades diuréticas leves, sendo também eficaz no tratamento de hidropisia, litíase renal e na redução da hipertensão (JONES *et al.*, 1991). Está também associada na prevenção da disfunção erétil, agindo como antioxidante (MOHAMMED; AL-BAYATI, 2014) e também é utilizada para o tratamento da hepatomegalia, icterícia e giardíase (ABU-REIDAH *et al.*, 2013). A melancia (*Citrullus lanatus*) é uma fruta pertencente à família Cucurbitaceae, sendo um dos cultivares mais produzidos no mundo e de grande importância econômica. Desde 2012 o Brasil ocupa a quarta posição na produção mundial dessa fruta, sendo que em 2015 produziu 938 toneladas (FAO, 2012; IBGE, 2016).

Alguns alimentos e determinados nutrientes têm sido associados com o sucesso reprodutivo dos animais ao longo da história (MOHAMMED; AL-BAYATI, 2014). A disfunção erétil (DE) ou impotência é uma doença altamente prevalente, cuja etiologia é principalmente vasculogênica, sendo definida como a incapacidade para atingir e/ou manter a ereção peniana suficiente para permitir uma relação sexual satisfatória (RYAN; GAJRAJ, 2012; TOMADA *et al.*, 2013). É uma desordem médica comum que afeta principalmente homens com mais de 40 anos de idade (SHAMLOUL; GHANEM, 2013). O envelhecimento pode resultar em DE, que é parcialmente atribuída ao decréscimo de óxido nítrico (NO) e aumento da geração de radicais livres (KOVAC *et al.*, 2014). Estima-se que por volta de 2025, aproximadamente 350 milhões de homens serão afetados em todo mundo (AYTA *et al.*, 1999). Apesar de ser considerada desordem benigna, esta disfunção pode impactar de forma significativa na qualidade de vida do indivíduo, interferindo com a sua saúde física, mental e social (GRIECO *et al.*, 2008). A disfunção erétil tem uma relação positiva com a síndrome metabólica (SM) (SANTOS *et al.*, 2006) e está também associada com doença arterial coronariana subclínica, sendo considerada um marcador de eventos cardiovasculares futuros. A maior prevalência de DE em pacientes com fatores de risco cardiovasculares reflete a disfunção endotelial subjacente, definida como a redução da biodisponibilidade de NO (TOMADA *et al.*, 2013). Trata-se, portanto, de uma doença séria, podendo resultar em prejuízos neurológicos, fisiológicos, hormonais, arteriais ou da combinação de todos esses fatores (THARAKAN; MANYAM, 2005).

A utilização de plantas medicinais ou de alimentos afrodisíacos para resolver o problema é comumente empregada (SANDRONI, 2001), inclusive sabe-se que desde o Egito antigo a DE já era um problema e uma preocupação e que a melancia era utilizada para o tratamento desta disfunção (HAIMOV-KOCHMAN *et al.*, 2005).

O avanço dos estudos envolvendo substâncias extraídas de plantas tem mostrado o efeito benéfico de alguns destes compostos sobre o funcionamento de diversos órgãos do corpo e sobre diversas patologias, incluindo o tratamento de doenças neurodegenerativas, câncer e doenças cardiovasculares, além de seus promissores efeitos sobre a reprodução (MONTEIRO *et al.*, 2008; ALBARRACIN *et al.*, 2012).

Dentre os principais componentes fitoquímicos da melancia estão o licopeno e a citrulina (SOTERIOU *et al.*, 2014). Os fitoquímicos são compostos biologicamente ativos encontrados em plantas em pequenas quantidades e que não são estabelecidos como nutrientes, mas contribuem significativamente para a proteção contra doenças degenerativas (AJAYI *et al.*, 2011).

A L-citrulina é um aminoácido isolado a partir do suco de melancia e tem papel na reprodução, como substrato para a produção de arginina. É também benéfica para o sistema cardiovascular, pulmonar, renal, gastrointestinal, na função hepática e sistemas imunitários, além de acelerar a cicatrização de feridas (MOHAMMED; AL-BAYATI, 2014; MORI *et al.*, 2015).

Tendo em vista a melancia ser fonte do aminoácido L-citrulina e na busca de um aprofundamento da possível ação deste aminoácido ou da fruta como afrodisíaco, o presente estudo propõe uma investigação dos seus efeitos sobre os parâmetros testiculares.

## **2 TESTICULO**

O testículo é um órgão complexo, produtor de hormônios e de células reprodutivas denominadas espermatozoides. O principal hormônio produzido é a testosterona, cuja síntese ocorre nas células de Leydig (RUSSELL *et al.*, 1990; RUSSELL; FRANÇA, 1995).

Circundando o testículo externamente encontramos uma camada de tecido conjuntivo denso não modelado denominada albugínea testicular. Posteriormente a albugínea se espessa,

emite septos para o interior do parênquima testicular até a região do mediastino, dividindo o testículo em lobos piramidais (RUSSELL *et al*, 1990; SIMÃO, 2000).

Funcionalmente o testículo dos mamíferos se divide em dois compartimentos: o tubular e o intertubular, também chamado de intersticial (RUSSELL *et al*, 1990). É majoritariamente ocupado pelos túbulos seminíferos, cujo volume ocupa em média 82% do órgão, o tecido intersticial ocupa em torno de 16% e a albugínea 2% (MORI; CHRISTENSEN, 1980). Os túbulos seminíferos não são inervados e nem vascularizados e constituem-se pela túnica própria, epitélio seminífero e lúmen. A túnica própria é formada por fibras colágenas, lâmina basal e células mioídes, responsáveis pela contratilidade, movimentando fluidos e auxiliando na propulsão dos espermatozoides. No epitélio seminífero encontramos as células de Sertoli, responsáveis pela manutenção da produção espermática, e as células germinativas originais (RUSSELL *et al*, 1990).

No compartimento intertubular encontramos as células de Leydig, produtoras de andrógenos, como testosterona e diidrotestosterona, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e uma diversificada população celular, em sua maioria constituída por fibroblastos, macrófagos e raros mastócitos (RUSSELL *et al*, 1990; SETCHELL, 1991; GODINHO, 1999).

## **2.1 Células de Leydig**

A célula de Leydig é o tipo celular mais frequentemente encontrada no compartimento intertubular (ZORZETTO, 2007). Estas células são responsáveis pela produção de cerca de 95% da testosterona circulante em um homem adulto, a qual é sintetizada a partir da molécula de colesterol (KERR; KNELL, 1988 *apud* MATA, 2009).

As mais importantes características exibidas por essas células são: a presença de Retículo Endoplasmático Liso (REL) e numerosas mitocôndrias. A biossíntese de testosterona é catalisada por enzimas localizadas predominantemente nas membranas do REL e citoplasma adjacente, embora algumas etapas ocorram nas membranas mitocondriais internas (MORI; CHRISTENSEN, 1980).

## **2.2 Células de Sertoli**

As células de Sertoli estão presentes no epitélio seminífero, juntamente com as células germinativas ou espermatogênicas. Estas células fornecem nutrientes e inúmeros outros fatores importantes para as células germinativas e secretam o fluido que vai em direção ao

lúmen tubular, o qual serve como veículo para o transporte dos espermatozoides para o epidídimo (MATA, 2009). Os túbulos seminíferos são constituídos, de sua porção externa para a interna, pela túnica própria, epitélio seminífero e lúmen. No lúmen tubular são encontrados o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozoides recém espermiados (RUSSEL *et al*, 1990).

Juntamente com as células mioides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o basal onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (preleptótenos e leptótenos), e o adluminal, onde se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides (RUSSEL *et al*, 1990; SHARPE *et al*, 1994 apud NEVES, 2016).

### **3 MELANCIA (*Citrullus lanatus*)**

#### **3.1 Origem e Caracterização**

A melancia é uma fruta pertencente à família Cucurbitaceae (JONES *et al.*, 1991), tendo suas origens nas regiões tropicais da África Equatorial, onde é cultivada há mais de 5.000 anos. Esta fruta foi introduzida no Brasil durante o tráfico de escravos, por volta dos anos de 1551 a 1557 (TORRES, 2007; GUNER; WEHNER, 2008).

O gênero *Citrullus* é classificado como parte da divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, subclasse Dilleniidae, ordem Violales e da família Cucurbitaceae. No gênero *Citrullus* estão incluídas quatro espécies: *Citrullus lanatus*, *C. colocynthis*, *C. ecirrhosus* e *C. rehmii* (EMBRAPA, 2010).

O gênero *Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum e Nakai, representa a melancia cultivada para consumo humano, de ampla distribuição mundial. *Citrullus lanatus* var. *citroides*, é uma espécie silvestre utilizada principalmente para a alimentação animal, encontrada no sul da África e cultivada em outras partes do mundo (EMBRAPA, 2010).

Do ponto de vista botânico, os frutos são típicos das cucurbitáceas, constituem-se de uma baga de paredes externas duras e internas carnosas, conhecida como pepônio. O tamanho pode

variar de menos de 1 kg a mais de 30 kg. No Brasil, o peso médio dos cultivares disponíveis varia de 4 a 12 kg (EMBRAPA, 2008). Quanto ao formato, os frutos de melancia podem ser redondos, oblongos, cilíndricos ou cônicos. A coloração externa da casca pode apresentar variações, com gradações de verde ou de amarelo (EMBRAPA, 2008). Internamente, a polpa pode ser branca, amarela, laranja, rósea ou vermelha, sendo esta última a mais comum entre as variedades comercializadas no Brasil. A cor da polpa não interfere no sabor do fruto, o qual pode variar de acordo com o cultivar, o estágio de maturação, a adubação utilizada, o controle da irrigação e com o estado fitossanitário da planta. O excesso de umidade e a baixa quantidade de potássio no solo podem tornar o fruto menos doce. A polpa também pode variar quanto à textura, havendo cultivares de polpa macia e outros de polpa firme ou crocante (EMBRAPA, 2008).

O aroma característico da melancia é conferido por ácidos graxos de cadeia média e curta, juntamente com geranial,  $\beta$ -ionone e neral que são alguns dos compostos norisoprenoide e monoterpeneo, presentes no fruto (NAZ *et al.*, 2014).

As sementes podem variar na coloração do tegumento (branca, creme, verde, vermelha, marrom-avermelhada, marrom e preta), com presença ou ausência de manchas (cor secundária do tegumento), tamanho variando de muito pequeno a muito grande. Geralmente são encontradas cerca de 200 a 800 sementes por fruto. Os cultivares triploides não apresentam sementes perfeitas ou apresentam um número reduzido, variando de 1 a 10 (EMBRAPA, 2010).

### **3.2 Produção de Melancia no Brasil**

O Brasil é o quarto maior produtor de melancia no mundo, precedido por China, Peru e Irã, sendo que a quantidade produzida nas lavouras temporárias, no ano de 2013, foi na ordem de 2.163.501 toneladas. A Região Nordeste foi responsável por 27,87% desta produção, a Região Sul 26,23%, a Região Norte 21,71%, a Região Centro-Oeste 14,19% e a Região Sudeste 10% (IBGE, 2013).

O IBGE (2013) registrou 26 Estados brasileiros mais o distrito Federal como produtores de melancia, sendo que o maior produtor é o Rio Grande do Sul, com 433.355 t (20,03%), seguido por Goiás com 245.270 t (11,34%), Bahia com 212.248 t (9,81%), Tocantins com 199.237 t (9,21%) e São Paulo com 174.940 t (8,09%).

### 3.3 Composição Nutricional e Utilização

É uma fruta refrescante, de agradável sabor e aroma e pode ser utilizada numa diversificada gama de fins culinários. Na maioria das vezes a polpa é consumida *in natura* e na forma de sucos, mas todas as suas partes podem ser utilizadas. Pode ser consumida também na forma de doces, compotas e farináceos.

Apesar de predominantemente se consumir o fruto da melancia *in natura*, na China e em outras regiões do Oriente Médio também se cultiva, para consumo, as sementes, que são ricas em ácidos graxos, proteína, tiamina, niacina, cálcio, fósforo, ferro e magnésio (EMBRAPA, 2010).

Em relação à casca, a sua maior utilização se dá na produção de pickles e doces, estando seu enfoque nutricional concentrado nos teores de minerais e de fibras do mesocarpo (parte branca) do fruto (PORTELA, 2009). Pode ser utilizada também como uma alternativa na produção de farinha, em substituição ao trigo e na redução de resíduos orgânicos (PEREIRA *et al.*, 2010). Dois estudos que analisaram a entrecasca da melancia encontraram uma alta taxa de cinzas, o que indica um alto teor de minerais (PORTELA, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010).

Segundo dados da Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TACO), a melancia crua possui 90,7% de umidade e 100 g do produto oferece 33 Kcal, 10 mg de magnésio, 104 mg de potássio, 6,1 mg de vitamina C, 61 µg de equivalente de retinol e 31 µg de equivalente de atividade de retinol (TACO, 2011). É também fonte das vitaminas B1 e B6 (NAZ *et al.*, 2014).

A polpa da melancia tem a coloração vermelha devido à presença de licopeno ou amarelada em consequência da presença de carotenos e xantofilas. Frutos de origem silvestre possuem amargor acentuado da polpa, que é atribuído à presença de cucurbitacina, um triterpenoide tetracíclico oxigenado, que é raro nas atuais variedades cultivadas (EMBRAPA, 2010).

A melancia é rica em carotenoides, principalmente licopeno, e constitui fonte dos aminoácidos arginina e citrulina. De acordo com as diferentes etapas do amadurecimento do fruto, o perfil dos aminoácidos se modifica, sendo que nos frutos mais verdes encontramos mais arginina e com o amadurecimento a concentração de citrulina é maior, atingindo o

máximo de 100-300 mmol/kg de peso seco e, portanto, quanto mais maduro o fruto, maior será a fonte de citrulina (RAWSON *et al.*, 2011; FISH, 2014; SOTERIOU *et al.*, 2014).

### **3.4 Uso Terapêutico**

Alimentos com alegação de propriedades funcionais têm um forte apelo populacional na busca da saúde e na prevenção e tratamento de doenças, principalmente doenças crônicas não transmissíveis (DCNT).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2016), as alegações de propriedades funcionais e ou de saúde utilizadas nos chamados “alimentos funcionais” estão relacionadas ao papel metabólico ou fisiológico que um nutriente (ex. fibras) ou não nutriente (ex. licopeno) tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções do organismo. Já as alegações de propriedades de saúde afirmam, sugerem ou implicam na existência de relação entre o alimento ou ingrediente com determinada doença ou condição relacionada à saúde. Sempre que uma empresa queira fazer este tipo de alegação, devem ser atendidas as diretrizes básicas para comprovação de propriedades funcionais ou de saúde (Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999). Os alimentos de competência da ANVISA que veiculem essas alegações devem ser enquadrados e registrados na categoria de alimentos com justificativas de propriedades funcionais ou de saúde (Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999) ou na categoria de substâncias bioativas e probióticos isolados (Resolução n. 02, de 07 de janeiro de 2002). Os ingredientes fontes dos nutrientes ou não nutrientes relacionados à alegação de propriedade funcional ou de saúde devem ser comprovadamente seguros para consumo humano (ANVISA, 2016).

A melancia é uma importante fonte do carotenoide licopeno e este tem sido associado na prevenção de várias DCNT, como dislipidemia, diabetes, oncogênese, doenças neurodegenerativas, osteoporose, entre outras. O licopeno tem um potencial nutracêutico e antioxidante, fornecendo proteção contra os radicais livres e danos oxidativos (NAZ *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo desempenha um papel muito importante em doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DP), que é a segunda doença neurodegenerativa mais comum entre os idosos em todo o mundo (GANESAN *et al.*, 2015). O estresse oxidativo tem sido também fortemente relacionado com a patogênese da doença de Alzheimer. Ko *et al.* (2016), analisando o efeito sinérgico da suplementação com pó de

melancia juntamente com *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* em um modelo geneticamente modificado de *Drosophila melanogaster*, encontraram um tempo maior de sobrevivência na faixa de 13 a 30 dias nas moscas tratadas em relação ao grupo com dieta controle. Eles testaram o efeito neuroprotetor desta suplementação, utilizando modelos de *Drosophila* AD que expressam A $\beta$ 42. Quando o A $\beta$ 42 foi expresso nos olhos em desenvolvimento, observou-se degenerescência ocular forte nas moscas do grupo controle em comparação com as moscas suplementadas. Também apoiando estes fenótipos neurológicos, a expressão ectópica de A $\beta$ 42 induziu fortemente a apoptose no cérebro larval, e a apoptose foi significativamente reduzida pela suplementação com melancia e *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Estas moscas geneticamente modificadas mostraram defeitos completos na capacidade de voo e esses fenótipos foram significativamente resgatados na presença da suplementação. Este estudo leva a concluir que esta suplementação aumenta a atividade da biogênese das mitocôndrias, podendo ser um importante efeito protetor na doença de Alzheimer.

Altas *et al.* (2011) verificaram o efeito hepatoprotetor do suco de melancia. Foram induzidos efeitos hepatotóxicos em ratos Wistar com o tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), que causa degradação peroxidativa dos lipídios da membrana do retículo endoplasmático, com consequente aumento dos níveis séricos de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina total (TB) e diminuição da albumina. O resultado do presente estudo indicou que o suco de melancia é capaz de proteger as atividades das enzimas hepáticas que desempenham papéis importantes no combate às espécies reativas de oxigênio. A diminuição significativa do produto de peroxidação hepática confirmou que o tratamento com suco de melancia poderia efetivamente proteger contra a peroxidação lipídica hepática induzida pelo CCl<sub>4</sub>.

A melancia é útil na redução da síndrome metabólica, devido às vitaminas A, B6 e C e os minerais magnésio e potássio. Estes, juntamente com licopeno, estão também associados com redução do risco de doenças cardiovasculares (NAZ *et al.*, 2014). É também fonte dos aminoácidos arginina (ARG) e citrulina (CIT), que são essenciais para a síntese de óxido nítrico (NO). Os seus metabólitos estão inter-relacionados e envolvidos no controle da pressão arterial (PA), da doença renal crônica (DRC) e da doença cardiovascular (DCV) (LIN *et al.*, 2013). Neste sentido, camundongos machos, knockout para receptores de LDL, foram utilizados para indução de aterosclerose por hipercolesterolemia, sendo então tratados com extrato de melancia, nas concentrações de 20-30 mg/g de citrulina. Houve menor ganho de

peso, com consequente redução significativa da massa gorda nos camundongos tratados com extrato de melancia em relação ao grupo controle, porém sem alteração nos parâmetros de ingestão entre os grupos. Nos grupos tratados houve também redução significativa do colesterol total plasmático, sendo que o LDL diminuiu significativamente no grupo tratado em relação ao controle, mas não houve diferença nas concentrações de colesterol VLDL e HDL entre os grupos de estudo. A área de lesão aterosclerótica foi medida na região do arco aórtico e na região torácica da aorta. Os camundongos que ingeriram o extrato de *C. lanatus* tinham reduzido significativamente a área da lesão, percentualmente, em ambas as regiões. Eles encontraram também diminuição das concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias (MCP-1 e IFN- $\gamma$ ) e aumento das citocinas anti-inflamatórias (IL-10) em camundongos que consumiram o extrato de melancia em relação ao controle. Houve também aumento no nível plasmático do aminoácido citrulina nos animais tratados. Este estudo demonstra que a suplementação dietética do extrato de *C. lanatus* oferece um benefício potencial de saúde contra as doenças cardiovasculares (PODURI *et al.*, 2013).

Figuroa *et al.* (2013), em estudo feito com mulheres pós-menopausa tratadas com cápsulas industrializadas de melancia liofilizada, observaram redução da rigidez arterial central e principalmente periférica, como também redução na pressão arterial sistólica e diastólica em relação às mulheres que receberam placebo. Em outro estudo, avaliando a eficácia de substâncias anti-hipertensivas sobre a pressão arterial (PA), usando o teste pressor frio e a exposição ao frio do corpo inteiro, a suplementação com melancia atenuou a magnitude da reflexão da onda aórtica e as respostas ao teste em adultos obesos de meia-idade com hipertensão. Isso evidencia que a suplementação de melancia pode proporcionar algum efeito cardioprotetor, atenuando os aumentos relacionados ao frio na hemodinâmica da aorta em adultos mais velhos com hipertensão arterial (FIGUEROA *et al.*, 2013; FIGUEROA *et al.*, 2014).

#### **4 L-CITRULINA**

O nome citrulina deriva do nome científico da melancia *Citrullus vulgaris*, porque foi isolada pela primeira vez da melancia, em 1930, sendo esta fruta excepcionalmente rica nesse aminoácido (KAORE *et al.*, 2013). A L-citrulina [ $\text{H}_2\text{NC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$ ] é um aminoácido não proteico, produto do ciclo do óxido nítrico (NO) e um precursor para a biossíntese da arginina, sendo que a maior parte da L-citrulina liberada para o sangue pelo

fígado é absorvida pelos rins. A arginina é um aminoácido condicionalmente dispensável para mamíferos adultos saudáveis, tornando-se indispensável para mamíferos jovens e adultos com trauma, lesão por queimadura, ressecção extensa do intestino delgado e insuficiência renal. Outra função biológica importante da L-citrulina é através da produção de NO, que é liberado durante a conversão da arginina a citrulina (JAYAPRAKASHA *et al.*, 2011; EL-HATTAB *et al.*, 2012; KAORE *et al.*, 2013; HOTTA *et al.*, 2014). Estudos *in vivo* sugerem que a L-citrulina é sintetizada e liberada a partir do intestino delgado, como um produto do metabolismo de glutamina e arginina (Figura 1).

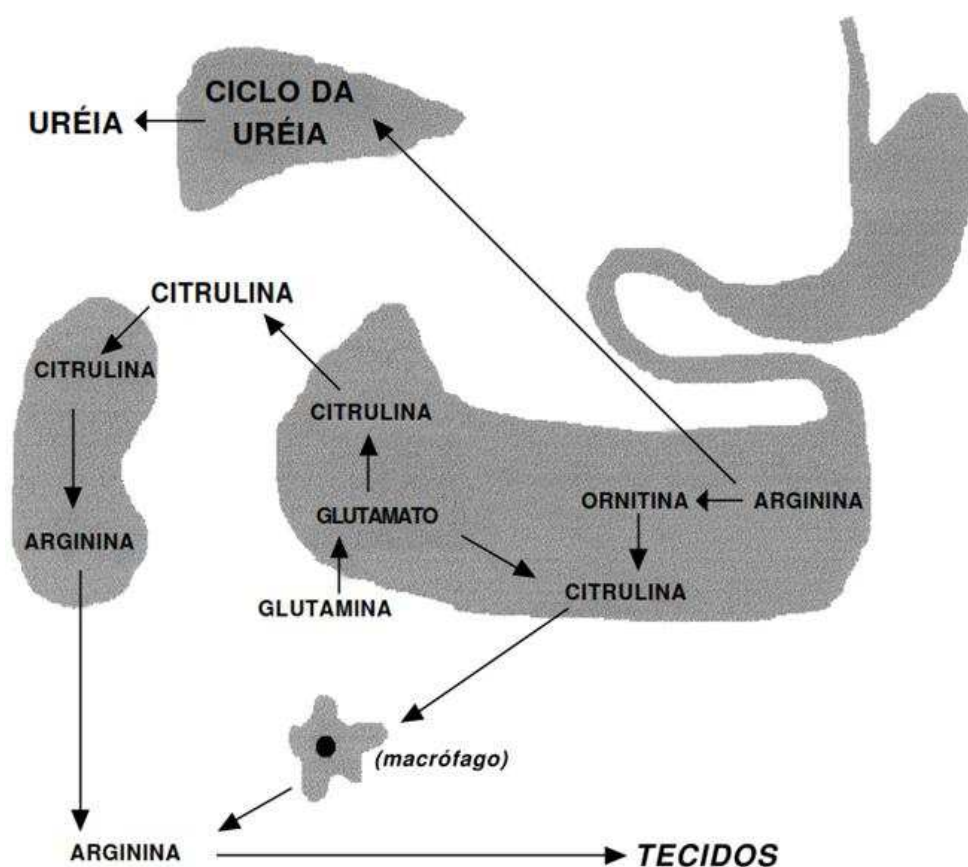


Figura 1: Metabolismo da citrulina. (Adaptado de Flora Filho; Zilberstein, 2000).

O aminoácido glutamina é geralmente considerado o principal precursor de citrulina no intestino delgado. A citrulina é um dos produtos finais do metabolismo da glutamina, o que representa 27,6% de glutamina metabolizada. A síntese de citrulina a partir de glutamina envolve cinco enzimas mitocondriais: glutaminase fosfato dependente, pirrolina-5-carboxilato sintase, ornitina aminotransferase, ornitina carbamoiltransferase e fosfato carbamoil-I

sintetase. As enzimas ornitina aminotransferase e pirrolina-5-carboxilato sintase são as principais enzimas envolvidas nesta regulação (BAHRI *et al.*, 2013).

Nos enterócitos, a glutamina é convertida em glutamato, pela enzima glutaminase e, em seguida a pirrolina-5-carboxilato de etila (P5C) sintase converte o glutamato para P5C, que é convertido em ornitina através aminotransferase ornitina (OAT). A ornitina, por meio da enzima ornitina-transcarbamilase (OTC), é então convertida em citrulina circulante. A arginina e prolina também podem atuar como precursores de citrulina intestinais. Todas as enzimas envolvidas na síntese de citrulina estão localizadas na mitocôndria de enterócitos. As atividades das duas enzimas que catabolizam a citrulina, sintase argininosuccinato (ASS) e liase argininosuccinato (ASL), são muito baixas no intestino, e assim, a citrulina não pode ser catabolizada nos enterócitos, sendo então liberada para a circulação. A maioria desta citrulina (~70%) é metabolizada no rim, onde é convertida em arginina pelas enzimas ASS e ASL presentes no túbulo contorcido proximal do néfron (EL-HATTAB *et al.*, 2012). Aproximadamente 83% da citrulina liberada pelo intestino são metabolizadas dentro do rim, um processo que representa 35% de citrulina circulantes. Arginina sintetizada é liberada para a veia renal e, em seguida, para a circulação sanguínea sistêmica (BAHRI *et al.*, 2013).

Quando a L-citrulina é administrada por via oral, é convertida em L-arginina pela enzima ASS e, subsequentemente, a L-arginina é convertida em NO e L-citrulina pela enzima ASL nos rins. Quando administrada oralmente, L-arginina é conhecida por ser extensivamente metabolizada pelas bactérias intestinais e pelas arginases livres e do intestino. No entanto, a administração oral de L-citrulina evitou estes passos metabólicos, aumentando os níveis de L-Arginina e NO de forma mais eficiente do que a administração oral de L-Arginina (HOTTA *et al.*, 2014). Devido ao fato da citrulina não ser utilizada pelos enterócitos, ela pode ser uma boa ferramenta na suplementação para idosos, podendo estimular a síntese de proteína muscular, uma vez que o envelhecimento está associado a uma alta taxa de sequestro esplênico de aminoácidos e sarcopenia (BAHRI *et al.*, 2013).

Estudando os efeitos da suplementação de L-citrulina e L-Arginina sobre a microcirculação do jejuno em camundongos submetidos à endotoxemia prolongada não letal, verificou-se que a suplementação de L-citrulina influenciou positivamente a perfusão microvascular intestinal em comparação com o grupo suplementado com L-Arginina e grupo controle (WIJNANDS *et al.*, 2012).

Na síndrome do intestino curto, a concentração plasmática de citrulina pode ser um bom biomarcador para falhas intestinais. Além disso, em ressecções intestinais maciças, a citrulinemia é muito reduzida, proporcionalmente à gravidade da doença ou outras patologias que comprometem a função intestinal, sendo que a sua suplementação pode restaurar o balanço nitrogenado e gerar grande quantidade de síntese de proteínas (COSTA *et al.*, 2012). Há confirmação que a concentração de citrulina sérica parece ser um marcador sensível e específico da massa de enterócitos residuais, podendo estar relacionada com a tolerância à nutrição enteral em crianças com síndrome do intestino curto (LÓPEZ *et al.*, 2013).

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivos Gerais**

Avaliar os efeitos da suplementação com extratos de melancia (*Citrullus lanatus*), sobre os parâmetros testiculares, através de análises morfométricas e estereológicas, utilizando-se camundongos albinos Swiss adultos como modelo experimental.

### **5.2 Objetivos Específicos**

No fruto:

- Identificar e quantificar o aminoácido L-citrulina, nos extratos da casca, polpa e semente de melancia;
- Dosar o teor de sólidos solúveis;
- Análise fitoquímica

Nos animais:

- Calcular índices gonadossomático (IGS), tubulossomático (ITS);
- Avaliar a proporção volumétrica e volume dos túbulos seminíferos;
- Calcular o diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero;
- Calcular o comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT) e comprimento por grama de testículo (CT/g);
- Calcular a área tubular, luminal e epitelial;
- Dosar a testosterona plasmática.

## 6 REFERÊNCIAS

ABU-REIDAH, I. M.; ARRAEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; GUTIÉRREZ, A. F. Profiling of phenolic and other polar constituents from hydro-methanolic extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) by means of accurate-mass spectrometry (HPLC–ESI–QTOF–MS). **Food Research International** 51: 354–362, 2013.

AJAYI, I.A.; AJIBADE, O.; ODERINDE, R. Preliminary phytochemical analysis of some plant seeds. **Research Journal of Chemical Sciences**. 1: 58-62, 2011.

ALBARRACIN, S. L.; STAB, B.; CASAS, Z.; SUTACHAN, J. J.; SAMUDIO, I.; GONZALEZ, J.; GONZALO, L.; CAPANI, F.; MORALES, L.; BARRETO, G. E. Effects of natural antioxidants in neurodegenerative disease. **Nutritional Neuroscience**. 15(1): 1-9, 2012.

ALTAS, S.; KIZIL, G.; KIZIL, M.; KETANI, A.; HARIS, P. I. Protective effect of Diyarbakır watermelon juice on carbon tetrachloride-induced toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**. 49: 2433–2438, 2011.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Atualizado em 22/12/2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em: 23/12/2016.

AYTA, I. A.; MCKINLAY, J. B.; KRANE, R. J. The likely world increase in erectile dysfunction between 1995 and 2025 and some possible policy consequences. **BJU International**. 84: 50-56, 1999.

BAHRI, S.; ZERROUK, N.; AUSSEL, C.; MOINARD, C.; CRENN, P.; CURIS, E.; CHAUMEIL, J. C.; CYNOBER, L.; SFAR, S. Citrulline: From metabolism to therapeutic use. **Nutrition**. 29: 479–484, 2013.

COSTA, I. F. O.; CARVALHO, C. M. R. G.; MELO, M. T. S. M.; FREITAS, B. J. S. A. Terapia Nutricional e Uso de Glutamina, Citrulina, Arginina e Probióticos na Síndrome do Intestino Curto. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**. 14(1): 57-61, 2012.

EL-HATTAB, A. W.; EMRICKB, L. T.; CRAIGENB, W. J.; SCAGLIA, F. Citrulline and arginine utility in treating nitric oxide deficiency in mitochondrial disorders. **Molecular Genetics and Metabolism**. 107 (3): 247–252, 2012.

EMBRAPA - **Cultivo da melancia em Rondônia** / Flávio de França Souza, Editor Técnico. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 103 p., 2008.

EMBRAPA – **Sistema de Produção de Melancia** / Rita de Cássia Souza Dias; Geraldo Milanez de Rezende. Embrapa Semiárido. Sistemas de Produção, 6. Ago/2010. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Melancia/SistemaProducaoMelancia/socioeconomia.htm> Acesso em: 15/12/2016.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Produção de melancia**. 2012. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 14/06/2015.

FIGUEROA, A.; WONG, A.; HOOSHMAND, S.; SANCHEZ-GONZALEZ, M. A. Effects of watermelon supplementation on arterial stiffness and wave reflection amplitude in postmenopausal women. **Menopause**. 20 (5): 573-577, 2013.

FIGUEROA, A.; WONG, A.; KALFON, R. Effects of Watermelon Supplementation on Aortic Hemodynamic Responses to the Cold Pressor Test in Obese Hypertensive Adults. **American Journal of Hypertension**. 27(7): 899-906, 2014.

FISH, W. W. The Expression of Citrulline and other Members of the Arginine Metabolic Family in Developing Watermelon Fruit. **International Journal of Agriculture Innovations and Research**. 2 (5): 665-672, 2014.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 46 (3), 2000.

GANESAN, P.; KO, H. M.; KIM, I. S.; CHOI, D. K. Recent trends in the development of nanophytobioactive compounds and delivery systems for their possible role in reducing oxidative stress in Parkinson's disease models. **International Journal Nanomedicine**. 10: 6757-6772, 2015.

GODINHO, C. L. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros**. 1999, 74fl. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Belo Horizonte, 1999.

GRIECO, A. S.; SIMÕES, F. A.; RODRIGUES, T. M.; CASTILHO, L. N. Como Diagnosticar e Tratar Disfunção erétil. **Revista Brasileira de Medicina**. 65 (12): 55-73, 2008.

GUNER, N.; WEHNER, T. C. Overview of Potyvirus resistance in watermelon. **In: Cucurbitacea – Proceedings of the IX the EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae**. 2008.

HAIMOV-KOCHMAN, R.; SCIAKY-TAMIR, Y.; HURWITZ, A. Reproduction concepts and practices in ancient Egypt mirrored by modern medicine. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**. 123: 3–8, 2005.

HOTTA, Y; SHIOTA, A. KATAOKA, T.; MOTONARI, M.; MAEDA, Y.; MORITA, M.; KIMURA, K. Oral L-citrulline supplementation improves erectile function and penile structure in castrated rats. **International Journal of Urology**. 21 (6): 608-612 , 2014.

IBGE– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **Produção Agrícola Municipal. Culturas Temporárias e Permanentes 2013**. Volume 40. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Producao\\_Agricola\\_Municipal \[anual\]/2013/pam2013.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2013/pam2013.pdf) > Acesso em: 16/12/2016.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **Lavoura temporária 2015**. Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=se&tema=lavouratemporaria2015>>  
Acesso em 15/03/2016.

JAYAPRAKASHA, G.K.; MURTHY, K.N.C.; PATIL, B. S. Rapid HPLC-UV method for quantification of L-citrulline in watermelon and its potential role on smooth muscle relaxation markers. **Food Chemistry**. 127: 240–248, 2011.

JONES J. B.; WOLF, B.; MILLS, H. A. Plant analysis handbook: a practical sampling, preparation, analysis and interpretation guide. **Athens: Micro Macro Publishing**, 213 p., 1991.

KAORE, S. N.; AMANE, H. S.; KAORE, N. M. Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. **Fundamental & Clinical Pharmacology**. 27(1): 35-50, 2013.

KERR, J. B.; KNELL, C. M. The fate of fetal Leydig cell during the development of the fetal and postnatal. **Development** 103: 535-544, 1988 *apud* MATA, W. S. **Toxicidade do arsenato e efeito protetor do guaraná e da vitamin E no aparelho reprodutor de camundongos**. 124 fl. Tese (Doutorado) em Biologia Celular e Estrutural – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

KO, D. G.; EUN, Y. B.; NA, J. U.; KIM, S. T. Synergistic Effect of Watermelon Powder and *Lactococcus lactis* subsp *lactis* Supplemented Diet Partially Ameliorates A $\beta$ 42-Dependent Lifespan Shorten and Flight Impairment in Transgenic Drosophila. **American Journal of Plant Sciences**, 7: 991-1000, 2016.

KOVAC, J. R.; DEYOUNG, L.; LEHMANN, K.J.; CHUNG E.; BROCK, G.B. The effects of combined free radical scavenger and sildenafil therapy on age-associated erectile dysfunction: An animal model. **Urology Annals**. 6(4): 314-320, 2014.

LIN, Y. J.; HSU, C. N.; LO, M. H.; HUANG, C. F.; CHIEN, S. J.; TAIN, Y. L. High Citrulline-to-Arginine Ratio Associated With Blood Pressure Abnormalities in Children With Early Chronic Kidney Disease. **Circulation Journal**, 77, 2013.

LÓPEZ, R. V.; MORENO, A. M. A.; BOLUDA, E. R.; NODAL, E. M. O.; MACÍAS, A. H.; BOZANO, G. P.; SANTAMARIA, M. L.; LARRUCEA, J. A. T. Valor de la citrulina plasmática como biomarcador de función intestinal en el síndrome de intestino corto y en el trasplante intestinal. **Anales de Pediatría**. 79(4): 218-223, 2013.

MATA, W. S. **Toxicidade do arsenato e efeito protetor do guaraná e da vitamina E no aparelho reprodutor de camundongos**. 124 fl. Tese (Doutorado) em Biologia Celular e Estrutural – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

MOHAMMED, A. I.; AL-BAYATI, M. A. Comparative study among watermelon crud extract, citrulline and lycopene on some reproductive indices In male mice. **International Journal**. 3 (6): 2307-2083, 2014.

MONTEIRO, J. C.; PREDES, F. S.; MATTA, S. L. P.; DOLDER, H. *Heteropterys aphrodisiaca* infusion reduces the collateral effects of Cyclosporine A on the testis. **The Anatomical Record** 291(7): 809-817, 2008.

MORI, A.; MORITA, M.; MORISHITA, K.; SAKAMOTO, K.; NAKAHARA, T.; ISHII, K. L-Citrulline dilates rat retinal arterioles via nitric oxide- and prostaglandin-dependent pathways in vivo. **Journal of Pharmacological Sciences** 127: 419-423, 2015.

MORI, H.; CHRISTENSEN, A. K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. **Journal of Cell Biology** 84 (2): 340, 1980.

NAZ, A.; BUTT, M. S.; SULTAN, M. T.; QAYYUM, M. M. N.; NIAZ, R. S. Watermelon lycopene and allied health claims. **Experimental and Clinical Sciences Journal**. 13: 650–660, 2014.

NEVES, A. C. **Efeitos do açaí (*Euterpe edulis*) em testículo de ratos expostos ao acetato de chumbo: análise morfométrica e estrutural**. 49 fl. Dissertação (Mestrado) em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2016.

PEREIRA, A. S.; MIGUEL, D. P.; CARVALHO, E. E. N. Caracterização de farinha da entrecasca de melancia (*Citrullus lanatus*) produzida na região sul do Tocantins. **Cadernos de Pós-graduação da FAZU**. 1, 2010.

PODURI, A.; RATERI, D. L.; SAHA, S. K.; SAHA, S.; DAUGHERTY, A. *Citrullus lanatus* ‘sentinel’ (watermelon) extract reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 24: 882–886, 2013.

PORTELA, J. V. F. **Estudo dos Aspectos Tecnológicos e de qualidade envolvidos no aproveitamento da casca e da polpa da melancia (*Citrullus lanatus* Schrad)**. 130 fl. Dissertação (Mestrado) em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa/PB, 2009.

RAWSON, A.; TIWARI, B.K.; PATRAS, A.; BRUNTON, N.; BRENNAN, C.; CULLEN, P.J.; O’DONNELL, C. Effect of thermosonication on bioactive compounds in watermelon juice. **Food Research International**. 44: 1168–1173, 2011.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D. L.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D., (Eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Florida: Cache River Press, pp: 1-40, 1990.

RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. Building a testis. **Tissue & Cell**, 27: 129-147, 1995.

RYAN, J. G.; GARJRAJ, J. Erectile dysfunction and its association with metabolic syndrome and endothelial function among patients with type 2 diabetes mellitus. **Journal Diabetes Complications**. 26: 141–147, 2012.

SANDRONI, P. Aphrodisiacs past and present: a historical review. **Clinical Autonomic Research**. 11: 303-307, 2001.

SANTOS, C. R. B.; PORTELLA, E. S.; AVILA, S. S.; SOARES, E. A. Fatores dietéticos na prevenção e tratamento de comorbidades associadas à síndrome metabólica. **Revista de**

**Nutrição.** 19(3): 389-401, 2006.

SETCHELL, B. P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P. T., (ed). *Reproduction in Domestic Animals*. 4. Ed. San Diego: Academic Press: 221-250, 1991.

SHAMLOUL, R.; GHANEM, H. Erectile dysfunction. **Lancet**. 381: 153-165, 2013.

SIMÃO, O. P. **Efeitos da adrenalectomia bilateral com associação sobre os níveis plasmáticos da testosterona em ratos previamente castrados por duas técnicas diferentes** 2000. 58f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental. Universidade Federal de São Paulo. 2000.

SOTERIOU, G. A.; KYRIACOU, M. C.; SIOMOS, A. S.; GERASOPOULOS, D. Evolution of watermelon fruit physicochemical and phytochemical composition during ripening as affected by grafting. **Food Chemistry**. 165: 282-289, 2014.

TACO - Tabela brasileira de composição de alimentos / NEPA – UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl. - Campinas: NEPA- UNICAMP, 161 p., 2011.

THARAKAN, B.; MANYAM, B. V. Botanical therapies in sexual dysfunction. **Phytotherapy Research**. 19: 457-463, 2005.

TOMADA, N.; TOMADA, I.; BOTELHO, F.; PACHECO-FIGUEIREDO, L.; LOPES, T.; NEGRÃO, R.; PESTANA, N.; CRUZ, F. Endothelial function in patients with metabolic syndrome and erectile dysfunction: a question of Angiotensin imbalance? **Andrology**. 1: 541-548, 2013.

TORRES, S. B. Germinação e desenvolvimento de plântulas de melancia em função da salinidade. **Revista Brasileira de Sementes**, 29(3): 77-82, 2007.

WIJNANDS, K. A. P.; VINK, H.; BRIEDE, J. J.; VAN FAASSEN, E. E.; LAMERS, W. H.; BUURMAN, W. A.; POEZE, M. Citrulline a More Suitable Substrate than Arginine to Restore NO Production and the Microcirculation during Endotoxemia. **Plos One**, 7 (5), 2012.

ZORZETTO, J. C. **Avaliação dos efeitos da inalação crônica de cocaína crack na espermatogênese de camundongos**. 2007. 89 fl. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Depto de Patologia. São Paulo, 2007.

# **ARTIGO: SUPLEMENTAÇÃO COM L-CITRULINA E EXTRATO ALCOÓLICO DOS DERIVADOS DE MELANCIA (*Citrullus lanatus*) INTERFERE NA ESPERMATOGÊNESE E NA SÍNTESE DE TESTOSTERONA EM CAMUNDONGOS ADULTOS**

## **RESUMO**

Ao longo da história evolutiva, alimentos e sucesso reprodutivo sempre foram associados e, além disso, a cultura popular coroou uma gama de alimentos como afrodisíacos. No Egito antigo a melancia já era utilizada como afrodisíaco. Este trabalho buscou avaliar os efeitos da suplementação com extratos de melancia e o aminoácido L-citrulina sobre os parâmetros testiculares, através de análises morfométricas, estereológicas e hormonal, utilizando-se camundongos albinos Swiss adultos. Foi feita a extração alcóolica de cada parte da melancia em separado (polpa, casca/entrecasca e semente), sendo este extrato submetido à quantificação do aminoácido L-citrulina. Utilizamos 80 camundongos Swiss adultos, em idade terminal do período reprodutivo (230 dias), divididos em 8 grupos, sendo que o grupo G1 recebeu apenas água destilada; o G2 aminoácido L-citrulina na dose de 30 mg/kg de peso corporal; o G3 Citrato de Sildenafil, sendo a dose calculada em equivalência a um humano de 70kg de peso corporal; o G4 extrato da casca/entrecasca com o equivalente de 30 mg de L-citrulina/kg de peso corporal; o G5 extrato da casca/entrecasca com o equivalente de 60 mg de L-citrulina/kg de peso corporal; o G6 extrato da polpa com o equivalente de 30 mg de L-citrulina/kg de peso corporal; o G7 extrato da polpa com o equivalente de 60 mg de L-citrulina/kg de peso corporal e o G8 recebeu 0,035 g de liofilizado do extrato da semente de melancia ressuspendido em água destilada. O volume diário que cada animal recebeu foi de 0,8mL, ministrados por gavagem, em dose única, durante 39 dias. Os grupos G4, G5, G6, G7, e G8 mostraram aumento significativo no diâmetro do túbulo seminífero em comparação com o grupo não tratado G1 e também com o grupo G2 e G3. Quanto à altura do epitélio, foi observado no grupo G7 aumento significativo, sendo que nos demais grupos tratados as alturas do epitélio foram maiores, embora sem significância estatística em relação ao grupo G1. O grupo G8 destacou-se na produção de testosterona. O extrato de melancia promoveu aumento dos parâmetros como diâmetro de túbulo e altura do epitélio, bem como aumento da testosterona plasmática.

Palavras chave: Melancia, túbulos seminíferos, testículo, L-citrulina, testosterona

# **L-CITRULIN SUPPLEMENTATION AND ALCOHOLIC EXTRACTION OF MELANCIA (*Citrullus lanatus*) DERIVATIVES INTERFERE IN SPERMATOGENESIS AND SYNTHESIS OF TESTOSTERONE IN ADULT MICE**

## **ABSTRACT**

Throughout evolutionary history, food and reproductive success have always been associated, in addition popular culture has crowned a range of foods like aphrodisiacs. In ancient Egypt the watermelon was already used as an aphrodisiac. This work aimed to evaluate the effects of supplementation with watermelon extracts and the amino acid L-citrulline on the testicular parameters. It was carried out morphometric, stereological and hormonal analyzes using Swiss adult albino mice. It was made the alcoholic extract of each different parts of the watermelon (pulp, husk / skewer and seed), and this extract was quantified the amino acid L-citrullina. It was used 80 adult Swiss mice at ending reproductive age (230 days), divided in 8 groups, the group G1 received only distilled water; G2 amino acid L-citrulline at a dose of 30 mg / kg of body weight; G3 Sildenafil citrate, the dose was calculated in equivalence to a human of 70 kg body weight; G4 bark / ribs extract with the equivalent of 30 mg L-citrulline per kg body weight; G5 bark / ribs extract with the equivalent of 60 mg L-citrulline / kg; G6 extract of the pulp with the equivalent of 30 mg of L-citrulline / kg; G7 extract of the pulp with the equivalent of 60 mg of L-citrulline/kg and the G8 received 0.035 g of lyophilized extract of the watermelon seed resuspended in distilled water. The daily volume that each animal received was 0.8 mL, given by gavage in a single dose for 39 days. In this study, the G4, G5, G6, G7, and G8 groups showed a significant increase in the diameter of the seminiferous tubule epithelium compared to the untreated group G1, the same was find with the group treated with the amino acid L-citrulline G2 and Sildenafil Hydrochloride G3. In the height of the epithelium a significant increase was observed in the G7, in the other treated groups the epithelium heights were higher, although it was not statistically significant in relation to the untreated group. The group G8 stood out in the production of testosterone. The watermelon extract promoted increased parameters in both tubule diameter and height of the epithelium and an increase of plasma testosterone.

**Key words:** Watermelon, seminiferous tubules, testis, L-citrulline, testosterone

## 1. Introdução

Desde os primórdios da humanidade ervas e alimentos são utilizados para fins medicinais, sendo que ao longo da história evolutiva, alimentos e sucesso reprodutivo sempre foram associados e, além disso, a cultura popular coroou uma gama de alimentos como afrodisíacos. Atualmente, as plantas medicinais e alimentos funcionais são utilizados por grande parte da população mundial como recurso medicinal alternativo para o tratamento de diversas enfermidades, inclusive a melhora do desempenho sexual (BARATA, 2005; CARNEIRO *et al.*, 2014; MOHAMMED; AL-BAYATI, 2014).

No Egito antigo a melancia já era utilizada como alimento afrodisíaco (HAIMOV-KOCHMAN *et al.*, 2005). Constitui uma fonte dos aminoácidos arginina e citrulina, que variam inversamente em suas concentrações de acordo com o grau de amadurecimento do fruto, sendo que no fruto verde encontramos maiores concentrações de arginina e quanto maior o grau de amadurecimento, maior o teor de citrulina. A L-citrulina é um produto do ciclo do óxido nítrico (NO) e um precursor para a biossíntese da arginina, sendo que a maior parte da L-citrulina, liberada para o sangue pelo fígado, é absorvida pelos rins. Outra função biológica importante da L-citrulina é através da produção de NO no endotélio, que é liberado durante a conversão da arginina a citrulina (JAYAPRAKASHA *et al.*, 2011; EL-HATTAB *et al.*, 2012; KAORE *et al.*, 2013; HOTTA *et al.*, 2014). A L-citrulina, embora não faça parte da síntese proteica, é utilizada no sistema de NO em seres humanos e animais e tem potencial papel antioxidante e vasodilatador, podendo efetuar a promoção de eventos em níveis celulares (MOHAMMED; AL-BAYATI, 2014).

O NO atua em nível hipotalâmico, estimulando a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que, na hipófise, estimula a liberação dos hormônios luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH). Assim, o NO é um dos responsáveis pelo funcionamento do eixo reprodutivo, sendo que a redução em sua concentração pode causar danos à função reprodutiva (MCCANN *et al.*, 1999).

O NO está presente no líquido seminal, sendo fundamental para que os espermatozoides desempenhem plenamente sua função de gameta. Além disso, ele atua no controle do relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso peniano e seus vasos sanguíneos aferentes, facilitando a ereção. Uma disfunção no endotélio prejudica o relaxamento da

musculatura lisa, impedindo a vasodilatação e levando à disfunção erétil (ADAMS, 1996; DUSSE *et al.*, 2003; GARIMELLA *et al.*, 2013).

O testículo dos mamíferos é dividido em dois compartimentos: tubular, constituído pelos túbulos seminíferos; e intertubular, formado pelas células de Leydig, células do conjuntivo (macrófagos, mastócitos e fibroblastos), leucócitos, vasos sanguíneos e linfáticos (RUSSELL *et al.*, 1990). No epitélio seminífero, componente funcional do túbulo, são encontradas células germinativas e células de Sertoli que, durante o processo espermatogênico, interagem de maneira complexa tanto física como bioquimicamente com as células germinativas. As células de Sertoli são responsáveis pela manutenção da integridade do epitélio seminífero, por secretar fluido para formar o lúmen tubular e participar do processo de espermiacção, realizar a fagocitose, permitir a movimentação de células ao longo do epitélio, secretar proteínas e regular o ciclo espermatogênico (RUSSELL *et al.*, 1990; SETCHELL, 1991; SHARPE *et al.*, 1994). A espermatogênese consiste no desenvolvimento das células germinativas, sendo caracterizada pela fase proliferativa (mitótica), espermatocitogênica (meiótica) e espermiogênica (diferenciação) (RUSSELL *et al.*, 1990).

Diversos produtos naturais podem interferir, positiva ou negativamente, na espermatogênese. Os alvos podem ser as células germinativas, as células de Sertoli ou os espermatozoides, que podem ser prejudicados morfológicamente ou na motilidade (FIORINI *et al.*, 2004 apud MATA, 2009).

Desta forma, objetivou-se analisar os efeitos de extratos de diferentes partes da melancia (*Citrullus lanatus*) e da L-citrulina, sobre os túbulos seminíferos de camundongos adultos, através de análises morfológicas e histométricas, e sua ação sobre a testosterona plasmática.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Melancia**

Os frutos foram adquiridos em lote único, em um mercado do município de Viçosa (Latitude: -20.7546, Longitude: -42.8825 20° 45' 17" Sul, 42° 52' 57" Oeste), localizado na zona da mata mineira, com a garantia de procedência de um único produtor.

O preparo da melancia foi feito no Laboratório de Corantes Naturais e Compostos Bioativos e no setor de Processamento de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciências e

Tecnologia de Alimentos da UFV. As frutas foram higienizadas e as partes (polpa, casca com entrecasca e sementes) foram separadas mecanicamente, com faca, descartando-se a região limítrofe entre a polpa e a entrecasca. As sementes foram retiradas manualmente e lavadas, para que não restassem resíduos de polpa.

Mediu-se o grau Brix ( $^{\circ}\text{Bx}$ ) da polpa e da entrecasca, em refratômetro analógico (Atago - Brasil), no setor de Processamento de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos da UFV.

As partes separadas foram secas em fornos com convecção forçada, em temperatura constante de  $65^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas. Após a secagem a casca/entrecasca e a semente foram trituradas em moinho industrial, no setor de Processamento de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos da UFV e a polpa triturada em multiprocessador doméstico Master Plus Pro (Walita, Brasil), no Laboratório de Histologia do departamento de Biologia Geral da UFV.

## 2.2 Preparo do extrato

O preparo do extrato foi feito no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Foi feita a extração alcóolica de cada parte da melancia em separado, sendo utilizada duas partes de álcool absoluto para uma parte de água destilada. Para cada 100g de soluto, utilizou-se 1000mL desta solução. Este material ficou por 30' em Ultra Sonic Clean Ultra Cleaner 1400 A (Unique), sendo posteriormente filtrado em bomba a vácuo TE/0581. O álcool foi evaporado em rotavapor IKA RV 10 digital, nos primeiros 10' a 100 rpm e por mais 35' a 150 rpm. Para assegurar que todo o álcool da amostra fosse realmente removido, a mesma ficou por 12 horas evaporando em capela.

Posteriormente o extrato da semente foi liofilizado durante 3 dias. Os extratos da polpa e da entrecasca/casca foram porcionados e congelados imediatamente após a evaporação.

Foi medido o  $^{\circ}\text{Bx}$  nos extratos de polpa e entrecasca/casca e dosada a citrulina nos três extratos.

As determinações do teor de citrulina nos extratos de melancia foram feitas por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), no cromatógrafo Shimadzu 20-AT acoplado a um detector de UV-visível de comprimento de onda 207 nm, com uma coluna C18 Kinetex (250

x 4,6 mm; 5 µm; 100 Å), em temperatura de 30 °C. Utilizamos ácido fosfórico 0,003 M como fase móvel e fluxo de 0,4 mL.min<sup>-1</sup>(RIMANDO; PERKINS-VEAZIE, 2005; JAYAPRAKASHA *et al.*, 2011). Este procedimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos, do Departamento de Microbiologia da UFV.

### 2.3 Fitoquímica

As análises fitoquímicas foram realizadas no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

#### 2.3.1 Fenóis e Taninos

Foram dissolvidos 0,5mL dos extratos da polpa e da entrecasca/casca e 5mg de extrato seco da semente em 5mL de água destilada e adicionadas 2 gotas de solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub> 1%. Qualquer mudança na coloração ou formação do precipitado é indicativo de reação positiva, quando comparado com o teste em branco (água + Sol. de FeCl<sub>3</sub>). Coloração inicial entre o azul e o vermelho, é indicativa da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo. Precipitado escuro de tonalidade azul indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) enquanto a verde indica presença de taninos catéquicos (condensados).

#### 2.3.2 Flavonoides

Foram dissolvidos 0,5mL dos extratos da polpa e da entrecasca/casca e 5mg de extrato seco da semente em 10mL de Metanol (95%). Foram adicionadas 5 gotas de HCl concentrado e raspas de Magnésio. O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

#### 2.3.3 Saponinas

Foram dissolvidos 0,5mL dos extratos da polpa e da entrecasca/casca e 5mg de extrato seco da semente em 5mL de água destilada. Em seguida, diluiu-se para 15mL agitando vigorosamente durante 2' em tubo fechado. A camada de espuma permanecendo estável por mais de meia hora, o resultado é considerado positivo para saponina espumídica.

#### 2.3.4 Alcaloides

Foram dissolvidos 0,5mL dos extratos da polpa e da entrecasca/casca e 5mg de extrato seco da semente em 5mL de solução de HCl a 5%. Foram separadas duas porções de 1mL em

tubos de ensaio, onde foram adicionadas gotas dos reativos de Bouchardat, que quando positivo forma um precipitado laranja e Dragendorff, que quando positivo forma um precipitado vermelho tijolo.

#### 2.4 Animais, grupos experimentais e tratamentos

O presente estudo foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-UFV- 43/2015.

Foram utilizados 80 camundongos Swiss procedentes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV, com a idade de 30 dias. Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Estrutural da UFV, em condições de temperatura, luz e umidade controladas, alojados em gaiolas individuais, recebendo água e comida *ad libitum*, sendo semanalmente pesados. Ao atingirem a idade de 230 dias dividiu-se aleatoriamente os animais em 8 grupos e iniciou-se o tratamento. O grupo controle negativo (G1) recebeu apenas água destilada; o grupo controle positivo I (G2) recebeu o aminoácido L-citrulina, na dose de 30 mg/kg de peso corporal; o grupo controle positivo II (G3) recebeu Citrato de Sildenafil, sendo a dose calculada em equivalência a um humano de 70kg de peso corporal; o grupo tratado com casca I (G4) recebeu extrato da casca/entrecasca com o equivalente de 30mg do aminoácido L-citrulina por kg de peso corporal; o grupo tratado com casca II (G5) recebeu extrato da casca/entrecasca com o equivalente de 60mg do aminoácido L-citrulina por kg de peso corporal; o grupo tratado com polpa I (G6) recebeu extrato da polpa com o equivalente de 30mg do aminoácido L-citrulina por kg de peso corporal; o grupo tratado com polpa II (G7) recebeu extrato da polpa com o equivalente de 60mg do aminoácido L-citrulina por kg de peso corporal; o grupo semente de melancia (G8) recebeu 0,035g de liofilizado do extrato da semente de melancia dissolvidos em água destilada. O volume diário que cada animal recebeu foi de 0,8mL, ministrados por gavagem, em dose única, durante 39 dias (ADLER, 1994).

#### 2.5 Coleta de Amostras

No 40º dia os animais foram anestesiados e eutanasiados, sendo o sangue coletado através de punção cardíaca. Os testículos foram então retirados, dissecados e pesados.

Os demais órgãos foram coletados, pesados e fixados ou congelados para análises posteriores.

## 2.6 Estudos histológicos

### 2.6.1 Preparação do testículo para microscopia de luz

Após os procedimentos iniciais os testículos foram imersos em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) por 24 horas. Posteriormente foram transferidos para álcool 70%, desidratados em série etanólica crescente e incluídos em glicol metacrilato (Historesin®, Leica). Secções de 3 µm de espessura foram obtidas em micrótomo rotativo (Reichert-Jung, Alemanha) usando navalhas de vidro. As secções foram coradas com azul de toluidina/borato de sódio 1%, montadas com Entellan (Merck) e utilizadas para análises morfométricas e histopatológicas. Para evitar a repetição das análises da mesma região, foram realizados cortes semisseriados, respeitando-se intervalos de 40 µm entre as secções. As imagens do parênquima foram obtidas em fotomicroscópio Olympus BX-53 com câmera Olympus DP-73 acoplada, no Laboratório de Sistemática Molecular, do Departamento de Biologia Animal da UFV. As análises morfométricas foram realizadas através dos programas Image Pro Plus e Image J.

### 2.6.2 Análises morfométricas do compartimento tubular

Para cálculo do peso do parênquima testicular (PPar) subtraiu-se o peso da albugínea do peso total dos testículos (peso bruto), obtendo-se assim o peso líquido da porção funcional do órgão. O índice gonadossomático (IGS), definido pela razão entre os pesos gonadal (PG) e corporal (PC), foi calculado usando a fórmula:  $(PG/PC) \times 100$  (AMANN, 1983). O índice parenquimossomático (IPS) foi calculado usando a fórmula:  $(PPar/PC) \times 100$ , onde PPar = peso do parênquima.

As densidades volumétricas (v/v%) de túbulo seminífero (DVT) e intertúbulo (DVI) foram obtidas utilizando-se uma grade contendo 266 pontos projetados sobre imagens digitalizadas (100x) do parênquima testicular, totalizando 5320 pontos por animal. Foram registrados pontos coincidentes sobre túnica própria, epitélio seminífero, lúmen e intertúbulo e, em seguida, calculado o percentual dos pontos sobre cada componente.

Para cálculo dos volumes de túbulo seminífero, epitélio seminífero, túnica própria e lúmen tubular utilizou-se a fórmula:  $\text{Volume} = \% \text{ do elemento} / 100 \times \text{peso do parênquima}$ .

De posse desses dados calculou-se o índice tubulossomático (ITS) de acordo com a fórmula:  $(VT/PC) \times 100$ , onde VT = volume tubular. Para o cálculo do índice epiteliossomático (IES) utilizou-se a seguinte fórmula:  $(VE/PC) \times 100$ , onde VE = volume do epitélio seminífero.

O diâmetro tubular médio foi obtido a partir de 20 secções transversais de túbulo seminífero para cada animal, sendo escolhidas as mais circulares possíveis, independentes do estágio em que se encontravam. Considerou-se para tal abordagem o menor diâmetro observado em cada secção transversal, conforme recomendação de Berndtson (1977). A altura do epitélio seminífero foi mensurada na mesma secção transversal em que foi aferido o diâmetro dos túbulos seminíferos. Neste caso, considerou-se a distância desde a túnica própria até a borda luminal, tomando-se duas medidas diametralmente opostas em cada secção transversal, sendo considerada como medida representativa a média das duas. O diâmetro do lúmen foi obtido subtraindo-se o diâmetro tubular das duas alturas obtidas para o epitélio seminífero.

Foram calculadas as áreas tubular (ART), luminal (ARL) e epitelial (ARE), de acordo com as fórmulas:  $ART = \pi \cdot r^2$ , onde r = raio tubular;  $ARL = \pi \cdot r^2$ , onde r = raio luminal;  $ARE = ART - ARL$ .

O comprimento total (CT) dos túbulos seminíferos, em metros, 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:  $CT = VTS / \pi r^2$ , onde VTS = volume total dos túbulos seminíferos,  $\pi r^2$  = área da secção transversal dos túbulos seminíferos e r = raio tubular (ATTAL; COUROT, 1963). O comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo foi calculado dividindo-se o comprimento total pelo peso bruto dos testículos.

## 2.7 Testosterona sérica

A concentração sérica de testosterona foi obtida pelo método de quimioluminescência, utilizando-se kit Access<sup>®</sup> Testosterone (Beckman, USA). Os resultados foram expressos em ng/dL.

## 2.8 Análises Estatísticas

Comparações entre os grupos foram feitas através de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK). Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. O nível de significância considerado foi de  $p \leq 0,05$ .

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis totais (°Bx) foi medido na porção interior da polpa e na entrecasca do fruto *in natura*. Após a obtenção do extrato, o °Bx foi medido no extrato da polpa e no extrato da casca juntamente com a entrecasca (Tabela 1). Os valores encontrados na polpa variaram de 10 a 12,5, próximos aos valores encontrados por Grangeiro (2003) que encontrou entre 11,2 e 12 °Bx. A média de 11,5 deste estudo foi bem maior que a observada por Leão *et al.* (2006), que encontraram a média de 8,18 °Bx. Esta diferença indica que nossos frutos tinham maior grau de amadurecimento, pois o teor de sólidos solúveis totais representa uma medida da concentração de açúcares e outros sólidos diluídos na polpa ou suco do fruto, sendo um parâmetro fundamental para a avaliação da qualidade (GRANGEIRO, 2003; LEÃO *et al.*, 2006).

Ao medirmos o °Bx na melancia *in natura* na porção casca/entrecasca medimos somente na entrecasca, devido à textura, já o extrato foi feito com estas partes misturadas. Buzinaro *et al* (2016) em seu estudo sobre fabricação de doce com a entrecasca de melancia, encontraram na entrecasca °Bx = 4 ( $\pm 0,00$ ). Encontramos a média de 5 ( $\pm 0,69$ ) (Tabela 1), em valores que variaram de 4 a 6 °Bx, o que mostra que a casca também possui variação no teor de sólidos solúveis.

Obviamente encontramos valores bem mais altos nos extratos produzidos em relação à fruta *in natura*, uma vez que nesse processamento há uma concentração dos açúcares e demais sólidos da amostra.

Tabela 1. Teor de sólidos solúveis (°Bx) presentes no fruto e no extrato de melancia.

<b>Grau Brix</b>		
	<i>In natura</i>	Extrato
<b>Polpa</b>	11,5 ( $\pm 0,82$ )	52,7
<b>Entrecasca/Casca</b>	5 ( $\pm 0,69$ )	43,6

#### 3.2 Teor do aminoácido L-citrulina

Foram encontrados somente traços do aminoácido L-citrulina no extrato alcóolico da semente de melancia. Nos extratos da polpa e da entrecasca/casca foram encontrados teores

significativos de L-citrulina, sendo que estes valores foram de 1,36 g/L e 1,27 g/L, respectivamente.

A importância principal da dosagem de L-citrulina nos extratos que produzimos é para garantir a ingestão adequada e podermos comparar os efeitos entre a suplementação do aminoácido isolado e os diferentes extratos da fruta. Tendo em vista que a administração oral de L-Citrulina aumenta os níveis de L-Arginina e NO de forma eficiente e que o decréscimo de óxido nítrico (NO) e aumento da geração de radicais livres podem estar associados à disfunção erétil e disfunções na espermatogênese, faz-se importante também essa dosagem (HOTTA *et al.*, 2014; KOVAC *et al.*, 2014).

Os teores de L-citrulina encontrados na literatura variam bastante, tanto entre diferentes cultivares de melancias, quanto nos resultados das análises. Esta variação foi na ordem de 3,9 a 28,5 mg/g de peso seco, ficando, portanto, nossos valores dentro desta margem. O teor de citrulina em melancias de polpa vermelha foi inferior aos encontrados em melancias de polpa amarela e laranja (7,4 – 28,5 e 14,2 mg/dwt g, respectivamente) (TEDESCO *et al.*, 1984; RIMANDO; PEARKINS-VEAZIE, 2005; TARAZONA-DIAZ *et al.*, 2011; DAVIS *et al.*, 2013). Trabalhamos com a melancia de polpa vermelha e frutos com desejável grau de amadurecimento, utilizamos o método de quantificação rápida por HPLC-UV proposto por Jayaprasca *et al.* (2011) e nossos resultados ficaram entre os valores encontrados na literatura.

### 3.3 Biometria corporal e testicular

Uma forma de verificar a produção espermática é através do peso testicular, pois esta atividade é altamente correlacionada com o peso gonadal, podendo induzir alterações no tamanho e no peso dos testículos (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Neste estudo não encontramos variações significativas nos pesos dos animais, nos pesos das gônadas, nos índices gonadossomático (IGS), túbulossomático (ITS), parenquimossomático e epitéliossomático (IES) entre os grupos de animais tratados e em relação ao grupo controle (G1) (Tabela 2). Morais *et al.* (2012), em estudo suplementando coelhos com geleia real, também não encontraram diferenças no peso das gônadas e no IGS entre o grupo controle e os grupos tratados. Chierigatto (2005), testando diferentes concentrações de extratos de raízes de *H. afrodisíaca* e *A. arvensis* em ratos Wistar, também não encontrou diferenças no IGS entre tratados e controle, embora tenha encontrado aumento no peso dos testículos dos animais tratados. Em outro estudo, também com camundongos suíços, tratados com extrato aquoso de

*Ouratea semiserrata*, também não foram encontradas diferenças no peso corporal, peso testicular e peso do parênquima (MATTA, 2008).

Tabela 2. Biometrias, corporal e testicular, de animais controle e tratados com L-citrulina, citrato de sildenafil e diferentes concentrações de extratos de casca/entrecasca, polpa e semente de *Citrullus lanatus*.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
<b>PC</b>	42,44±4,3 <sup>a</sup>	50,44±4,9 <sup>a</sup>	46,97±4,4 <sup>a</sup>	48,86±2,9 <sup>a</sup>	44,90±3,3 <sup>a</sup>	46,18±8,8 <sup>a</sup>	49,79±5,5 <sup>a</sup>	50,62±7,5 <sup>a</sup>
<b>PT</b>	0,216±0,021 <sup>a</sup>	0,243±0,048 <sup>a</sup>	0,249±0,051 <sup>a</sup>	0,214±0,045 <sup>a</sup>	0,204±0,031 <sup>a</sup>	0,232±0,033 <sup>a</sup>	0,236±0,028 <sup>a</sup>	0,222±0,030 <sup>a</sup>
<b>IGS</b>	0,51±0,03 <sup>a</sup>	0,48±0,07 <sup>a</sup>	0,53±0,12 <sup>a</sup>	0,44±0,08 <sup>a</sup>	0,45±0,06 <sup>a</sup>	0,50±0,06 <sup>a</sup>	0,47±0,09 <sup>a</sup>	0,44±0,07 <sup>a</sup>
<b>ITS</b>	0,46±0,03 <sup>a</sup>	0,45±0,07 <sup>a</sup>	0,49±0,09 <sup>a</sup>	0,41±0,06 <sup>a</sup>	0,42±0,05 <sup>a</sup>	0,46±0,05 <sup>a</sup>	0,43±0,04 <sup>a</sup>	0,40±0,07 <sup>a</sup>
<b>IES</b>	0,38±0,02 <sup>a</sup>	0,37±0,05 <sup>a</sup>	0,41±0,07 <sup>a</sup>	0,33±0,05 <sup>a</sup>	0,34±0,04 <sup>a</sup>	0,38±0,04 <sup>a</sup>	0,37±0,05 <sup>a</sup>	0,34±0,06 <sup>a</sup>

G1 = água; G2 = L-citrulina; G3 = Citrato de Sildenafil; G4 = extrato entrecasca/casca, contendo 30mg/kg de citrulina; G5 = extrato entrecasca/casca, contendo 60mg/kg de citrulina; G6 = extrato de polpa contendo 30mg/kg de citrulina; G7 = extrato de polpa contendo 60mg/kg de citrulina; G8 = extrato liofilizado de semente. PC = peso corporal (g); PT = peso do testículo (g); IGS = índice gonadossomático; ITS = Índice Túbulossomático; IES = Índice Epitéliossomático. Valores expressos como média ±desvio padrão (DP).

### 3.4 Proporção volumétrica e volume dos componentes testiculares

Como os túbulos seminíferos são os principais componentes testiculares em pesquisas envolvendo parâmetros reprodutivos masculinos, o cálculo dos percentuais e volume dos elementos tubulares (epitélio, lúmen, túnica própria), constituem uma importante abordagem (Tabela 3) .

Neste estudo, com exceção do grupo tratado com extrato da semente de melancia (G8), todos os demais grupos tratados apresentaram aumento significativo do percentual de túbulo seminífero em relação ao grupo controle (G1) (Tabela 3). O grupo tratado com a dose de polpa de melancia contendo 60 mg de L-citrulina por kg de peso do animal (G7) teve também um aumento significativo do percentual de epitélio em relação ao grupo controle e aos demais grupos tratados. No entanto, nenhum dos grupos apresentou diferenças estatísticas nos parâmetros de volume de túbulo e volume do epitélio e relação ao grupo controle.

No grupo tratado com casca/entrecasca com a dosagem de 60 mg de L-citrulina por kg de peso do animal (G5) encontramos um aumento significativo no percentual do lúmen em relação aos demais grupos, isso mostra que, embora este grupo tenha apresentado o maior percentual de túbulo entre todos os grupos, ele não teve diferença significativa na altura do epitélio, pois o lúmen é que ficou aumentado (Tabela 3).

Os grupos tratados com o Citrato de Sildenafil (G3) e com extrato de casca/entrecasca de melancia na dosagem de 30mg/kg de L-citrulina (G4) tiveram um aumento significativo no percentual da túnica própria em relação aos animais não tratados (G1). Os grupos tratados com extrato entrecasca/casca, contendo 60mg/kg de L-citrulina (G5), extrato de polpa contendo 30mg/kg de L-citrulina (G6), extrato de polpa contendo 60mg/kg de L-citrulina e extrato liofilizado de semente de melancia (G8) tiveram uma significativa redução no percentual da túnica em relação aos animais não tratados (G1) (Tabela 3).

Nenhum dos grupos apresentou diferenças significativas em relação aos volumes do túbulo, do epitélio e do lúmen (Tabela 3). No entanto, os grupos tratados com L-citrulina (G2) e Citrato de Sildenafil (G3) apresentaram aumento significativo no volume de túnica própria em relação ao grupo controle (G1).

Estudos feitos com frutas, especialmente a melancia, em relação às funções testiculares são escassos na literatura. Mohammed e Al-Bayati (2014) em estudo comparativo utilizando extrato de melancia, citrulina e licopeno, encontraram aumento significativo em relação ao volume (cm<sup>3</sup>), dimensão (cm) e densidade (g/cm<sup>3</sup>) testicular nos grupos tratados em relação ao grupo não tratado, sendo que no grupo tratado com extrato de melancia, eles encontraram um aumento ainda maior no volume testicular e à dimensão em relação aos demais tratamentos.

Tabela 3: Densidade volumétrica (V/v) e volumetria dos túbulos seminíferos de animais controle e tratados com L-citrulina, citrato de sildenafil e diferentes concentrações de extratos de casca/entrecasca, polpa e semente de melancia *Citrullus lanatus*.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
<b>%TUB</b>	89,35±2,44 <sup>a</sup>	93,92±1,40 <sup>b</sup>	93,26±1,29 <sup>b</sup>	92,67±1,04 <sup>b</sup>	94,03±0,92 <sup>b</sup>	92,66±1,09 <sup>b</sup>	92,35±1,62 <sup>b</sup>	91,15±2,21 <sup>ab</sup>
<b>%EPIT</b>	74,17±2,30 <sup>a</sup>	77,47±1,98 <sup>a</sup>	77,28±2,23 <sup>a</sup>	75,47±2,67 <sup>a</sup>	76,04±2,55 <sup>a</sup>	76,38±2,03 <sup>a</sup>	79,60±2,74 <sup>b</sup>	77,61±2,96 <sup>a</sup>
<b>%LUM</b>	9,90±2,18 <sup>a</sup>	10,30±1,36 <sup>a</sup>	9,55±1,10 <sup>a</sup>	11,09±2,53 <sup>a</sup>	12,93±2,39 <sup>b</sup>	11,62±2,17 <sup>a</sup>	8,10±2,25 <sup>a</sup>	8,83±2,09 <sup>a</sup>
<b>%TUN</b>	5,28±0,69 <sup>a</sup>	6,15±0,61 <sup>a</sup>	6,43±1,03 <sup>b</sup>	6,12±0,74 <sup>b</sup>	5,06±0,54 <sup>c</sup>	4,66±0,41 <sup>c</sup>	4,65±0,43 <sup>c</sup>	4,71±0,44 <sup>c</sup>
<b>V.TUB</b>	0,187±0,018 <sup>a</sup>	0,222±0,046 <sup>a</sup>	0,225±0,048 <sup>a</sup>	0,192±0,042 <sup>a</sup>	0,186±0,027 <sup>a</sup>	0,208±0,030 <sup>a</sup>	0,211±0,026 <sup>a</sup>	0,196±0,028 <sup>a</sup>
<b>VEPIT</b>	0,155±0,014 <sup>a</sup>	0,183±0,036 <sup>a</sup>	0,187±0,042 <sup>a</sup>	0,157±0,034 <sup>a</sup>	0,150±0,023 <sup>a</sup>	0,171±0,021 <sup>a</sup>	0,182±0,025 <sup>a</sup>	0,167±0,024 <sup>a</sup>
<b>VLUM</b>	0,021±0,005 <sup>a</sup>	0,025±0,007 <sup>a</sup>	0,023±0,004 <sup>a</sup>	0,023±0,008 <sup>a</sup>	0,026±0,005 <sup>a</sup>	0,027±0,008 <sup>a</sup>	0,018±0,005 <sup>a</sup>	0,019±0,006 <sup>a</sup>
<b>V.TUN</b>	0,011±0,002 <sup>a</sup>	0,015±0,002 <sup>b</sup>	0,015±0,002 <sup>b</sup>	0,013±0,003 <sup>ab</sup>	0,010±0,002 <sup>a</sup>	0,011±0,002 <sup>a</sup>	0,011±0,001 <sup>a</sup>	0,010±0,001 <sup>a</sup>

G1 = água; G2 = L-citrulina; G3 = Citrato de Sildenafil; G4 = extrato entrecasca/casca, contendo 30mg/kg de citrulina; G5 = extrato entrecasca/casca, contendo 60mg/kg de citrulina; G6 = extrato de polpa contendo 30mg/kg de citrulina; G7 = extrato de polpa contendo 60mg/kg de citrulina; G8 = extrato liofilizado de semente. %TUB = Percentual de túbulo; %EPIT = percentual de epitélio; %LUM =

percentual de lúmen; %TUN = percentual de túnica própria; V.TUB = Volume do túbulo; V.EPIT = Volume do epitélio; V.LUM = Volume do lúmen; V.Tun = Volume da túnica própria. Valores expressos como média  $\pm$ desvio padrão (DP).

### 3.5 Diâmetro de túbulo, altura do epitélio e comprimento do túbulo seminífero

A medida do diâmetro tubular e a altura do epitélio constituem bons indicadores da atividade espermatogênica (FRANÇA; RUSSELL, 1998; PAULA *et al.*, 2002). A altura do epitélio seminífero acompanha as variações do ciclo do epitélio seminífero, como número de camadas do epitélio seminífero e de células mioídes, e assim, é um importante parâmetro para a avaliação da produção espermática (PAULA, 1999).

Neste estudo, os grupos tratados com extratos das diferentes partes da melancia (G4, G5, G6, G7 e G8), em diferentes concentrações, mostraram aumento significativo no diâmetro do túbulo seminífero em comparação com o grupo não tratado (G1) e também com o grupo tratado com o aminoácido L-citrulina (G2) e Cloridrato de Sildenafil (G3). Quanto à altura do epitélio, foi observado no grupo tratado com a polpa de melancia contendo 60 mg de L-citrulina por kg de peso do animal (G7) aumento significativo, sendo que nos demais grupos tratados as alturas do epitélio foram maiores, embora sem significância estatística em relação ao grupo não tratado (Tabela 4). Este aumento na altura do epitélio, principalmente no grupo G7, pode estar relacionado a um aumento na atividade espermatogênica. Comparando o grupo tratado com extrato de polpa de melancia contendo 30 mg de L-citrulina por kg de peso do animal (G6) com o grupo tratado com polpa de melancia contendo 60 mg de L-citrulina por kg de peso corporal (G7) encontramos grande diferença entre eles na altura do epitélio, o que nos leva a concluir que os efeitos são potencializados, com o aumento da dose.

Deve ser destacado que este estudo foi feito com o extrato da fruta, que no processamento foi submetida a uma temperatura de 65°C, podendo com isso ter melhorado a biodisponibilidade do licopeno presente na polpa e este ter agido em sinergia com a L-citrulina do fruto, proporcionando o aumento destes parâmetros tubulares.

Houve redução do comprimento do túbulo seminífero em todos os tratamentos, exceto para o grupo G3 (Tabela 4). Chierigatto (2005), administrando cronicamente extratos de raízes de *Heteropterys aphrodisiaca* e *Anemopaegma arvense* a ratos Wistar adultos também encontrou esse mesmo perfil. Como não encontramos aumento nas gônadas e encontramos aumento no diâmetro do túbulo, era de se esperar esta redução no comprimento, por lógica em relação ao espaço ocupado pelo túbulo nas gônadas.

Ao compararmos o grupo tratado com extrato de melancia na mesma concentração do aminoácido L-citrulina (30 mg/kg de peso), encontramos valores numéricos superiores no diâmetro do túbulo e na altura do epitélio no extrato da fruta em relação ao aminoácido L-citrulina isolado (Tabela 4). Mohammed e Al-Bayati (2014), trabalhando com extrato alcoólico de melancia na dose de 500mg/kg de peso, comparando com grupo não tratado e com grupo tratado com a mesma dosagem de L-citrulina deste nosso trabalho (30mg/kg) e com um grupo tratado com licopeno (5mg/kg), por 38 dias, também encontraram melhor resposta no grupo tratado com extrato da fruta. Os autores descrevem aumento significativo na contagem de espermatozoides no grupo tratado com melancia em comparação com o grupo controle, sendo também significativamente mais elevado do que o grupo tratado com L-citrulina e licopeno. No entanto Mohammed e Al-Bayati (2014) não quantificaram a quantidade do aminoácido L-citrulina no extrato alcóolico de melancia, não podendo, portanto, afirmar a equivalência entre as doses ao compararem os grupos experimentais. No nosso trabalho o aminoácido L-citrulina foi quantificado nos extratos para assegurar equivalência nas quantidades, o que permite uma análise comparativa entre os grupos.

Em estudo feito com licopeno, em adultos de ambos os sexos, onde foram ofertadas duas doses de suco de melancia (0,26 kg e 0,52 kg), verificaram que a conversão de citrulina do suco de melancia em arginina foi efetiva, porque embora a citrulinemia se mantivesse constante, as dosagens de arginina sérica aumentaram nos grupos tratados, sendo maior, na maior dose de suco (COLLINS *et al.*, 2007). Em estudo feito com mulheres pós-menopausa, foi observada redução da rigidez arterial central e principalmente periférica, redução na pressão arterial sistólica e diastólica nas mulheres tratadas com cápsulas industrializadas de melancia liofilizada em relação ao grupo placebo (FIGUEROA *et al.*, 2013). Possivelmente houve uma melhora da biodisponibilidade deste aminoácido na fruta, seja por consequência da sua atuação em sinergia com outro biocomposto como, por exemplo, o licopeno ou pela melhora da vascularização. Provavelmente estes fatores, presentes na fruta possam ter inferido nestes resultados, levando a uma melhor resposta da fruta em relação ao aminoácido isolado.

Tabela 4. Diâmetro tubular, altura de epitélio e comprimento de túbulos seminíferos de animais controle e tratados com L-citrulina, citrato de sildenafila e diferentes concentrações de extratos de casca/entrecasca, polpa e semente de melancia *Citrullus lanatus* .

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
<b>DT</b>	199,21±18,24 <sup>d</sup>	206,73±14,95 <sup>a</sup>	194,05±19,95 <sup>a</sup>	237,70±13,61 <sup>b</sup>	238,49±8,77 <sup>b</sup>	252,26±12,36 <sup>b</sup>	258,31±13,10 <sup>b</sup>	237,44±7,12 <sup>b</sup>
<b>AE</b>	61,35±0,63 <sup>a</sup>	72,91±3,53 <sup>a</sup>	70,60±8,82 <sup>a</sup>	83,73±6,45 <sup>a</sup>	82,61±4,64 <sup>a</sup>	84,73±4,84 <sup>a</sup>	120,77±64,5 <sup>b</sup>	84,37±4,42 <sup>a</sup>
<b>CTS/T</b>	3,17±0,71 <sup>a</sup>	3,38±0,36 <sup>a</sup>	4,04±1,11 <sup>b</sup>	2,24±0,46 <sup>c</sup>	2,16±0,37 <sup>c</sup>	2,16±0,4 <sup>c</sup>	2,08±0,15 <sup>c</sup>	2,28±0,29 <sup>c</sup>
<b>CTS/gT</b>	14,71±3,12 <sup>a</sup>	14,16±1,88 <sup>a</sup>	16,16±3,05 <sup>a</sup>	10,54±1,33 <sup>b</sup>	10,56±0,70 <sup>b</sup>	9,34±0,96 <sup>b</sup>	8,87±0,83 <sup>b</sup>	10,32±0,55 <sup>b</sup>

G1 = água; G2 = L-citrulina; G3 = Citrato de Sildenafil; G4 = extrato entrecasca/casca, contendo 30mg/kg de citrulina; G5 = extrato entrecasca/casca, contendo 60mg/kg de citrulina; G6 = extrato de polpa contendo 30mg/kg de citrulina; G7 = extrato de polpa contendo 60mg/kg de citrulina; G8 = extrato liofilizado de semente. DT: diâmetro do túbulo (µm); AE: altura do epitélio (µm); CTS/T: comprimento do túbulo seminífero por testículo (m); CTS/gT: comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo. Valores expressos como média ±desvio padrão (DP).

### 3.6 Áreas do túbulo, lúmen e epitélio e a Relação túbulo/epitelial

A área tubular aumentou em todos os grupos tratados com melancia, com destaque para o grupo G7. Como não houve grandes alterações na área do lúmen dos grupos tratados com melancia, o aumento verificado na área tubular refletiu o aumento da área do epitélio seminífero (Tabela 5). Com base nas áreas obtidas foi calculada a relação túbulo/epitelial (RTE), que indica a área restante do túbulo seminífero após a subtração da área ocupada pelo epitélio. Quanto menor for essa relação, maior será a área ocupada pelo epitélio na constituição do túbulo seminífero. A menor relação observada neste trabalho foi no grupo G7, o que representa uma maior área de epitélio, com conseqüente aumento do grau de espermatogênese neste grupo.

Tabela 5. Áreas de túbulo, lume e epitélio, e relação túbulo/epitelial de animais controle e tratados com L-citrulina, citrato de sildenafil e diferentes concentrações de extratos de casca/entrecasca, polpa e semente de melancia *Citrullus lanatus*.

	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8
<b>ARTUB</b>	0,0313±0,0036 <sup>a</sup>	0,0336±0,0049 <sup>a</sup>	0,0298±0,0052 <sup>a</sup>	0,0444±0,0050 <sup>b</sup>	0,0446±0,0033 <sup>b</sup>	0,0498±0,0050 <sup>b</sup>	0,0524±0,0057 <sup>c</sup>	0,0442±0,0026 <sup>b</sup>
<b>ARLU</b>	0,0048±0,0002 <sup>a</sup>	0,0029±0,0004 <sup>ab</sup>	0,0022±0,0004 <sup>b</sup>	0,0039±0,0004 <sup>a</sup>	0,0042±0,0004 <sup>a</sup>	0,0052±0,0005 <sup>ac</sup>	0,0073±0,0008 <sup>a</sup>	0,0037±0,0004 <sup>a</sup>
<b>AREP</b>	0,0265±0,0054 <sup>a</sup>	0,0307±0,0048 <sup>b</sup>	0,0276±0,0051 <sup>a</sup>	0,0405±0,0049 <sup>b</sup>	0,0404±0,0033 <sup>c</sup>	0,0446±0,0049 <sup>c</sup>	0,0451±0,0048 <sup>c</sup>	0,0405±0,0026 <sup>c</sup>
<b>RTE</b>	1,62±0,14 <sup>d</sup>	1,42±0,05 <sup>b</sup>	1,38±0,05 <sup>b</sup>	1,42±0,07 <sup>b</sup>	1,45±0,05 <sup>b</sup>	1,49±0,05 <sup>b</sup>	1,16±0,17 <sup>c</sup>	1,41±0,07 <sup>b</sup>

G1 = água; G2 = L-citrulina; G3 = Citrato de Sildenafil; G4 = extrato entrecasca/casca, contendo 30mg/kg de citrulina; G5 = extrato entrecasca/casca, contendo 60mg/kg de citrulina; G6 = extrato de polpa contendo 30mg/kg de citrulina; G7 = extrato de polpa contendo 60mg/kg de citrulina; G8 = extrato liofilizado de semente. ARTUB – Área do túbulo; ARLU = Área do lúmen; AREP = Área do epitélio; RTE = Relação túbulo/epitélio. Valores expressos como média ±desvio padrão (DP).

### 3.7 Testosterona sérica

A testosterona aumentou em todos os grupos tratados, exceto no grupo G6, sendo particularmente notável em G8, que recebeu extrato liofilizado da semente (Figura 3). A testosterona e seu metabólito (5  $\alpha$ -dihidrotestosterona) levam a um aumento nos níveis de NO – importante vasodilatador – no tecido erétil do corpo cavernoso. Além deste efeito vascular na ereção peniana, ela melhora também a libido proporcionando maior desejo para se ter uma relação sexual (SARRIS *et al.*, 2016).

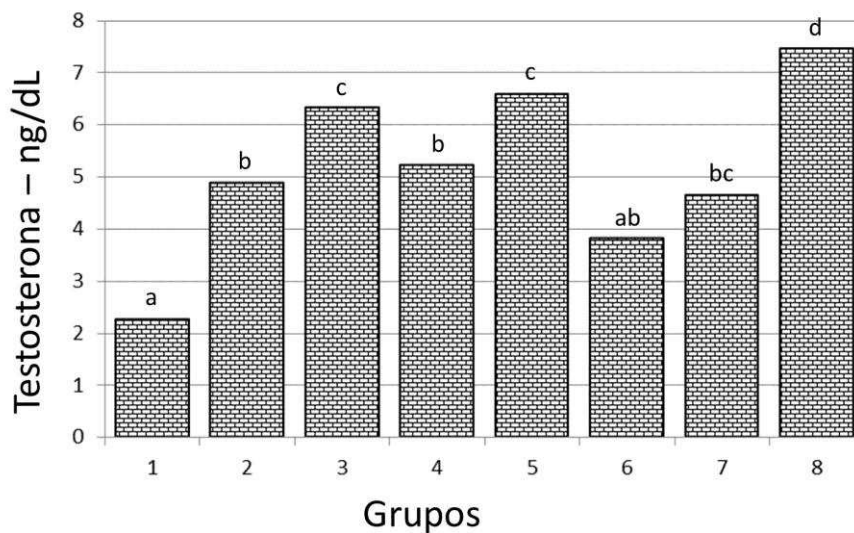


Figura 3. Concentrações de testosterona em animais controle e tratados com L-citrulina, citrato de sildenafil e diferentes concentrações de extrato de casca/entrecasca, polpa e semente de melancia. 1 = água; 2 = L-citrulina; 3 = Citrato de Sildenafil; 4 = extrato entrecasca/casca, contendo 30mg/kg de citrulina; 5 = extrato entrecasca/casca, contendo 60mg/kg de citrulina; 6 = extrato de polpa contendo 30mg/kg de citrulina; G7 = extrato de polpa contendo 60mg/kg de citrulina; G8 = extrato liofilizado de semente.

Em nossa análise fitoquímica encontramos a presença de alcaloides na amostra do extrato liofilizado da semente de melancia. No entanto, utilizamos um método simples (Reagente de Dragendorff), onde somente detectamos, não quantificamos e nem qualificamos estes alcaloides. Uma possível explicação para este aumento tão acentuado da testosterona na semente pode estar associada exatamente a estes alcaloides, uma vez que alguns estudos associam os alcaloides presentes em algumas plantas, à atividade afrodisíaca a estas atribuídas (BARROS, 2005; SILVA *et al.*, 2012).

O grupo tratado com o extrato da semente foi o grupo que teve maior ganho absoluto de peso corporal, muito embora não tenha se diferenciado estatisticamente dos demais. Este

ganho de peso pode estar relacionado ao efeito anabolizante da testosterona sobre a massa muscular destes animais.

#### **4. Conclusões**

Ao compararmos os grupos tratados com os extratos da melancia em relação aos grupos tratados com o aminoácido L-citrulina, encontramos, nos grupos tratados com extratos de melancia um maior aumento dos parâmetros proporção de túbulo seminífero, diâmetro tubular, aumento da área tubular e epitelial. Estes parâmetros são indicativos de aumento da atividade espermatogênica nos grupos tratados com extratos da fruta. Houve redução do comprimento dos túbulos seminíferos dos grupos tratados, o que é explicado pelo aumento do seu diâmetro.

Não encontramos variações significativas nos pesos dos animais, nos pesos das gônadas, nos índices gonadossomático (IGS), túbulossomático (ITS), parenquimossomático e epitéliossomático (IES) entre os grupos de animais tratados e dos animais do grupo controle (G1).

Embora todos os grupos tratados, de um modo geral, apresentaram melhores resultados na testosterona, o grupo tratado com extrato liofilizado da semente tem maior potencial ativador comparado às outras partes da fruta, o que pode ser evidenciado pelo notável aumento da testosterona sérica. Nas análises fitoquímicas encontramos a presença de alcaloides no extrato liofilizado da semente de melancia, que pode ter relação a este aumento maior da testosterona no grupo tratado com esta fração.

## 5. Referências

- ADAMS, H. R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. 209: 1297-1302, 1996.
- ADLER, I. D. Comparison of the duration of spermatogenesis between male rodents and humans. Series: Current Issues in Mutagenesis and Carcinogenesis, No. 69. **Mutation Research**. 352: 169-172, 1994.
- AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**. 57: 380-403, 1983.
- ATTAL, J.; COUROT, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. **Annales de biologie animale, biochimie, biophysique**. 3(3): 219-241, 1963.
- BARATA, L. Empirismo e ciência: Fonte de novos Fitomedicamentos. **Ciência e Cultura**. 57 (4): 4-5, 2005.
- BARROS, A. R. C. **Efeito pró-erétil de uma fração rica em alcalóides isolada de *aspidosperma ulei* markgr: estudo *in vivo* e *in vitro***. 2005.199 fl. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2005.
- BERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: A review. **Journal of Animal Science**. 44: 817-833, 1977.
- BUZINARO, A. C.; ALVES, A. B.; CREPALDI, V. B.; COSTA, D. L. M. G. Elaboração de doce de mesocarpo de melancia cristalizado colorido e saborizado artificialmente. **Anais do XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, X GIGR Section IV International Technical Symposium**. FAURGS. Gramado RS, 2016.
- CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais** – UEG/Campus de Iporá, 3(2): 44-75, 2014.
- CHIEREGATTO, L. C. **Efeito do tratamento crônico com extratos de *Heteropterys afrodisíaca* O. Mach e *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. no testículo de ratos Wistar adultos**. 2005. 67fl. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2005.
- COLLINS, J. K.; WU, G.; PERKINS-VEAZIE, P.; SPEARS, K.; CLAYPOOL, P. L.; BAKER, R. A.; CLEVIDENCE, B. A. Watermelon consumption increases plasma arginine concentrations in adults. **Nutrition**. 23: 261-266, 2007.
- DAVIS, D.; W.; LEWIS, M. L.; QI, W.; HART, D. A.; SMITH, F. G. Age dependent expression and distribution of nitric oxide (NO) synthase isoforms in the ovine kidney. **Open Journal of Molecular and Integrative Physiology**, 3 (2): 61-70, 2013.
- DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. 39 (4): 343-350, 2003.
- EL-HATTAB, A. W.; EMRICKB, L. T.; CRAIGENB, W. J.; SCAGLIA, F. Citrulline and arginine utility in treating nitric oxide deficiency in mitochondrial disorders. **Molecular Genetics and Metabolism**. 107 (3): 247-252, 2012.

- FIGUEROA, A.; WONG, A.; HOOSMAND, S.; SANCHEZ-GONZALEZ, M. A. Effects of watermelon supplementation on arterial stiffness and wave reflection amplitude in postmenopausal women. **Menopause** 20 (5): 573-577, 2013.
- FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Eds). **Male reproduction -a multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Communications, p.197-219. 1998.
- GARIMELLA, P. S.; PAUDEL, M. L.; ENSRUD, K. E.; MARSHALL, L. M.; TAYLOR, B. C.; FINK, H. A. Association Between Body Size and Composition and Erectile Dysfunction in Older Men: Osteoporotic Fractures in Men Study. **Journal of the American Geriatrics Society**. 61: 46–54, 2013.
- GRANGEIRO, L. C. **Produtividade e qualidade de frutos de melancia, em duas épocas de plantio, em função de fontes e doses de potássio**. 79 f. 2003. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – FCAV, UNESP, Jaboticabal, 2003.
- HAIMOV-KOCHMAN, R.; SCIAKY-TAMIR, Y.; HURWITZ, A. Reproduction concepts and practices in ancient Egypt mirrored by modern medicine. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**. 123: 3–8, 2005.
- HOTTA, Y.; SHIOTA, A.; KATAOKA, T.; MOTONARI, M.; MAEDA, Y.; MORITA, M.; KIMURA, K. Oral L-citrulline supplementation improves erectile function and penile structure in castrated rats. **International Journal of Urology**. 21 (6): 608-612, 2014.
- JAYAPRAKASHA, G.K.; MURTHY, K.N.C.; PATIL, B. S. Rapid HPLC-UV method for quantification of L-citrulline in watermelon and its potential role on smooth muscle relaxation markers. **Food Chemistry**. 127: 240–248, 2011.
- KAORE, S. N.; AMANE, H. S.; KAORE, N. M. Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future. **Fundamental Clinical Pharmacology**. 27(1): 35-50, 2013.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. 27:137-138, 1965.
- KOVAC, J. R.; DEYOUNG, L.; LEHMANN, K.J.; CHUNG E.; BROCK, G.B. The effects of combined free radical scavenger and sildenafil therapy on age-associated erectile dysfunction: An animal model. **Urology Annals**. 6(4): 314-320, 2014.
- LEÃO, D. S.; PEIXOTO, J. R.; VIEIRA, J. V. Teor de licopeno e de sólidos solúveis totais em oito cultivares de melancia. **Bioscience Journal**. 22 (3): 7-15, 2006.
- MATTA, A. P. L. F. **Efeitos do extrato aquoso da raiz de *Ouratea semiserrata* (Mart.) Engl. (Ochnaceae) sobre os testículos de camundongos suíços adultos**. 57 fl. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, 2008.
- MATA, W. S. **Toxicidade do arsenato e efeito protetor do guaraná e da vitamina E no aparelho reprodutor de camundongos**. 124 fl. Tese (Doutorado) em Biologia Celular e Estrutural – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2009.

McCANN, S.M.; MASTRONARDI, C.; WALCZEWSKA, A.; KARANTH, S.; RETTORI, V.; YU, W.H. The role of nitric oxide in reproduction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 32: 1367-1379, 1999.

MOHAMMED, A. I.; AL-BAYATI, M. A. Comparative study among watermelon crud extract, citrulline and lycopene on some reproductive indices in male mice. **International Journal of Research In Medical and Health Sciences**. 3(6): 7-14, 2014.

MORAIS, D. B.; BARBOSA, L. P.; MELO, B. E. S.; MATTA, S. L. P.; NEVES, M. M.; BALARINI, M. K.; RODRIGUES, M. V. Microscopia e morfometria de componentes tubulares de testículos de coelhos suplementados com geleia real. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 64 (4), 2012.

PAULA, T. A. R. **Estudo histológico quantitativo da atividade espermatogênica de cães SRD em diferentes faixas etárias após a puberdade**. 1992. 62f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.

PAULA, T. A. R.; COSTA, D. S.; MATTA, S. L. P. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. **Bioscience Journal**. 18: 121-136, 2002.

RIMANDO, A. M.; PERKINS-VEAZIE, P. M. Determination of citrulline in watermelon rind. **Journal of Chromatography**. A. 17;1078(1-2):196-200, 2005.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, D. L.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D., (Eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Florida: Cache River Press, pp: 1-40, 1990.

SARRIS, A. B.; NAKAMURA, M. K.; FERNANDES, L. G. R.; STAICHAK, R. L.; PUPULIM, A. F.; SOBREIRO, B. P. Fisiopatologia, avaliação e tratamento da disfunçãoerétil: artigo de revisão. **Rev Med** (São Paulo). 95(1):18-29, 2016.

SETCHELL, B. P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P. T., (ed). *Reproduction in Domestic Animals*. 4. Ed. San Diego: **Academic Press**: 221-250, 1991.

SHARPE R. M. Regulation of Spermatogenesis. In: KNOBIL E.; NEILL, J. D. *The Physiology of Reproduction*, **New York Haven Press**. 22: 1363-1434, 1994.

SILVA, C.V.; BORGES, F.M.; VELOZO, E.S. Phytochemistry of some Brazilian Plants with Aphrodisiac Activity. In: RAO, V. (Ed.). **Phytochemicals - A global perspective of their role in nutrition and health**. In Tech, p. 307-326. 2012.

TARAZONA-DÍAZ, M. P.; VIEGAS, J.; MOLDAO-MARTINS, M.; AGUAYO, E. Bioactive compounds from flesh and by-product of fresh-cut watermelon cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 91(5): 805–812, 2011.

TEDESCO, T. A.; BENFORD, S. A.; FOSTER, R. C.; BARNES, L. A. Free Amino Acids in *Citrullus vulgaris* (Watermelon). **Pediatrics**. 73: 879, 1984.