

**AMANDA MARTINS VIEL**

**EFEITOS DO EXTRATO DE *AGAVE SISALANA* Perrine SOBRE A  
TOXICIDADE OVARIANA E UTERINA, FERTILIDADE E  
PARÂMETROS FETAIS DE RATAS**

**ASSIS**

**2016**

**AMANDA MARTINS VIEL**

**EFEITOS DO EXTRATO DE *AGAVE SISALANA* Perrine SOBRE A  
TOXICIDADE OVARIANA E UTERINA, FERTILIDADE E  
PARÂMETROS FETAIS DE RATAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista para a obtenção do título de Mestra em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica).

Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isabel Cristina Cherici Camargo

ASSIS

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca da F.C.L. – Assis – Unesp

Viel, Amanda Martins

V659e      Efeitos do extrato de *Agave Sisalana* Perrine sobre a toxicidade ovariana e uterina, fertilidade e parâmetros fetais de ratas / Amanda Martins Viel. Assis, 2016.

54 f. : il.

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências e Letras de Assis – Universidade Estadual Paulista

Orientadora: Dra. Isabel Cristina Cherici Camargo

AMANDA MARTINS VIEL

EFEITOS DO EXTRATO DE "AGAVE SISALANA" Perrine  
SOBRE A TOXICIDADE OVARIANA E UTERINA,  
FERTILIDADE E PARÂMETROS FETAIS DE RATAS

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Ciências e Letras – UNESP para a obtenção  
do título de Mestrado Acadêmico em  
Biociências (Área de Conhecimento:  
Caracterização e Aplicação da Diversidade  
Biológica)

Data da Aprovação: 17/03/2016

COMISSÃO EXAMINADORA



Presidente: PROFA. DRA. Isabel Cristina Cherici Camargo - UNESP/Assis



Membros: PROF. DR. Régildo Márcio Gonçalves da Silva - UNESP/Assis



PROFA. DRA. Eneri Vieira de Souza Leite Mello - UEM/Maringá

*Dedico este trabalho a minha querida avó  
**Palmira** (in memoriam), tão importante na  
minha formação como pessoa. Levo seus conselhos  
sempre comigo, no coração!*

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me guiar e me fortalecer em todos os momentos da minha vida.

À minha mãe **Maria**, pelo amor incondicional e por toda dedicação que sempre teve para me ver bem e feliz.

Ao meu pai **Carlos**, pelo amor e por sempre me incentivar a buscar os meus objetivos.

Ao meu irmão **Carlinhos**, por todo amor e por ser sempre tão positivo comigo.

Ao meu namorado **Gustavo**, meu grande companheiro, sempre presente nos momentos mais importantes da minha vida! Por todo amor, compreensão, paciência e apoio.

À minha orientadora **Dra. Isabel Cristina Cherici Camargo**, pela oportunidade, confiança, paciência e por todos os ensinamentos e conselhos que vou levar para vida. Toda minha admiração pela excelente profissional e pelo grande coração que pude conhecer ao longo desses anos.

Ao professor **Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva**, por ter aceitado com alegria o convite para compor a banca. E por toda dedicação à profissão, a minha admiração.

À professora **Dra. Eneri Vieira de Souza Leite Mello**, que gentilmente aceitou o convite para compor a banca.

À professora **Dra. Lucinéia dos Santos**, por ter despertado minha vocação para a área acadêmica e pelo incentivo e confiança depositados em mim, desde a graduação.

Às colegas de mestrado **Janine Mailho Gimenis**, uma pessoa iluminada que me ajudou muito com seus bons conselhos e a **Maria José Malagutti Ferreira** com quem dividi tantos momentos de alegrias e sufocos.

À minha querida amiga **Gláucia Aparecida Arruda**, pela amizade, tantas conversas, conselhos, desabafos e muitas risadas.

Ao ex-aluno de graduação **Willian Eduardo Neres**, pela paciência e disponibilidade em me transmitir todo seu conhecimento de laboratório, sempre com muito bom humor.

Aos colegas de laboratório **Vinícius, Bianca e Mirian** pelo auxílio nos momentos necessários, sempre muito prestativos em ajudar.

Aos amigos de trabalho **Gislene, Yara, Claudinha, Jefferson e Cléo** pelas palavras positivas nos momentos de dificuldades e pelos momentos de descontração e de muitas risadas que passamos juntos.

Aos funcionários da Universidade Estadual Paulista, em especial à **Eliane**, pela disposição e auxílios prestados.

À todos os professores do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação, meus sinceros agradecimentos.

*“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar, porque descobri no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.”*

*Cora Coralina*

VIEL, Amanda Martins. **Efeitos do extrato de *Agave sisalana* Perrine sobre a toxicidade ovariana e uterina, fertilidade e parâmetros fetais de ratas.** 2016. 54f. Dissertação (Mestrado em Biociências). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

## **RESUMO**

A *Agave sisalana* (sisal) é amplamente cultivada em território brasileiro. Foi constatada a presença de cinco saponinas esteroidais nessa planta, responsáveis por várias atividades farmacológicas, destacando-se as atividades antifúngica e anti-inflamatória. Popularmente, o sisal ainda é utilizado para o tratamento de doenças hepáticas, tuberculose e sífilis. Devido à sua ação detergente, as saponinas são dotadas de efeito tóxico em função de sua propriedade de causar ruptura em eritrócitos, liberando hemoglobina, além de outros efeitos ainda relacionados à lise celular como as ações inseticida, anti-helmíntica e ictiotóxica. Considerando-se as diversas ações farmacológicas da *A. sisalana* e seu amplo uso na medicina popular, torna-se necessário investigar seus possíveis efeitos colaterais na reprodução feminina, os quais ainda não foram relatados na literatura.

**Palavras-chave:** Sisal, gonadotoxicidade, reprodução, fetotoxicidade.

VIEL, Amanda Martins. **Effects the *Agave sisalana* Perrine extract on ovarian and uterine toxicity, fertility and fetal parameters of rats**. 2016. 54f. Dissertation (Master in Biosciences). – Faculdade de Ciências e Letras, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Assis, 2016.

### **ABSTRACT**

The *Agave sisalana* (sisal) is largely cultivated in Brazil. It was found the presence of five steroidal saponins that plant, responsible for various pharmacological activities, especially the anti-fungal and anti-inflammatory activities. Popularly, sisal is also used for the treatment of liver diseases, tuberculosis and syphilis. Due to its detergent action, saponins are equipped with toxic effect due to its property to cause disruption in erythrocytes, releasing hemoglobin, and other effects still related to cell lysis as the actions insecticide, anthelmintic and ichthyotoxic. Considering the various pharmacological actions of *A. sisalana* and its widespread use in folk medicine, it is necessary to investigate their possible side effects on female reproduction, which have not yet been reported in the literature.

**Keywords:** Sisal, gonadotoxicity, reproduction, fetotoxicity.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                   | <b>11</b> |
| Plantas medicinais.....                                                                                                                  | 11        |
| <i>Agave sisalana</i> Perrine.....                                                                                                       | 12        |
| Plantas medicinais na reprodução.....                                                                                                    | 16        |
| <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                    | <b>20</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                  | <b>21</b> |
| <b>Capítulo Único</b>                                                                                                                    |           |
| Efeitos do extrato de <i>Agave sisalana</i> Perrine sobre a toxicidade ovariana e uterina, fertilidade e parâmetros fetais de ratas..... | 25        |
| Anexo I.....                                                                                                                             | 50        |
| Anexo II.....                                                                                                                            | 52        |

## Introdução

### Plantas medicinais

Desde a antiguidade as plantas medicinais são amplamente utilizadas com fins terapêuticos, a fim de tratar, curar e prevenir as mais diversas enfermidades (ASSUNÇÃO; DE MOURA, 2009; RODRIGUES et al., 2011; SANTOS et al., 2011; DUNDER et al., 2013). Para uma parcela da população que não têm acesso ao atendimento primário de saúde, por encontrarem-se muito distantes dos centros de saúde ou por não possuírem recursos financeiros para manter um tratamento alopático, recorrem às terapias alternativas fazendo o uso de drogas vegetais (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008; VEIGA-JUNIOR, 2008; ROQUE; ROCHA; LOIOLA, 2010; SANTOS et al., 2011). Outros fatores, que ainda contribuem para o uso de plantas com fins medicinais, é a facilidade com que são adquiridas e a simplicidade em sua preparação (SANTOS et al., 2011).

Sabe-se que as plantas são capazes de sintetizar diversos compostos químicos denominados metabólitos secundários, que além de participarem do sistema de defesa da planta, como no caso das fitoalexinas, contém também outros metabólitos que possuem atividades farmacológicas comprovadas, como os flavonoides, alcaloides, triterpenos, taninos, lignanas (GURIB-FAKIM, 2006; BOTURA, 2011) e saponinas (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Existem cada vez mais estudos que demonstram as ações benéficas promovidas no organismo, pelos componentes fitoquímicos presentes nas plantas (SANTOS et al., 2011; DUNDER et al., 2013). Estudos etnobotânicos relatam que diversas plantas apresentam potencial antidiabético comprovado, como a *Aegle marmelos* (bael), a *Aloe barbadensis* (babosa), a *Catharanthus roseus* (vinca-de-gato) (GURIB-FAKIM, 2006) e a *Galega*

*officinalis* (arruda), esta última responsável pelo desenvolvimento do fármaco metformina, um hipoglicemiante oral amplamente utilizado na medicina tradicional (GURIB-FAKIM, 2006; CAVALLI et al., 2007).

Plantas medicinais têm se mostrado eficientes no tratamento de doenças que acometem o sistema nervoso central, por apresentarem ações hipnóticas e sedativas, como a *Valeriana officinalis* (valeriana), a *Piper methysticum* (kava-kava) e o *Hypericum perforatum* (erva-de-são-jão) (GURIB-FAKIM, 2006). Outras drogas vegetais com atividade anti-inflamatória e antioxidante são utilizadas para tratar distúrbios cardiovasculares, responsáveis por muitas mortes em todo o mundo, pois melhoram as condições que envolvem a circulação sanguínea. A atividade anti-inflamatória pode ser atribuída à presença de saponinas, enquanto a atividade antioxidante à presença de flavonoides e, entre as plantas que têm se destacado para esses fins, podemos citar a *Aesculus castanea* (castanha-da-Índia) e o *Ginkgo biloba* (Ginkgo biloba) (GURIB-FAKIM, 2006).

Embora existam estudos a respeito da utilização, da eficácia e da toxicidade das plantas medicinais, as bases científicas com informações adequadas que comprovem reais propriedades toxicológicas ainda são muito escassas e, com isso, existe um conceito errôneo de que os produtos de origem natural são isentos de efeitos colaterais no organismo e não representam quaisquer perigos para a saúde humana (VEIGA-JUNIOR, 2008; ASSUNÇÃO; DE MOURA, 2009; SANTOS et al., 2011).

### ***Agave sisalana* Perrine**

Originária da península de Yukatan, no México, a planta *Agave sisalana*, popularmente conhecida como sisal (MARTIN et al., 2009; QUEIROZ et al., 2012) é uma monocotiledônea, pertencente à família Agavaceae, subfamília Agavoidea (QUEIROZ et al.,

2012), gênero *Agave* e subgênero *Euagave*. É amplamente cultivada em território brasileiro, mais especificamente na região do Nordeste (MARTIN et al., 2009; BOTURA, 2011; QUEIROZ et al., 2012) em função do clima semiárido (DUNDER et al., 2013). É uma planta semixerófila resistente à secas prolongadas e a altas temperaturas (QUEIROZ et al., 2012).

O Brasil é o principal produtor e exportador mundial de sisal, responsável por 69% da produção global (RIBEIRO; BARRETO; COELHO, 2015), onde apenas 4% das folhas são aproveitadas para a extração de suas fibras, na fabricação de cordas, barbantes, cabos marítimos, tapetes, sacos, vassouras, estofamentos, artesanatos, além de possuírem aplicações na indústria de plástico, onde são utilizadas como reforço para polímeros comerciais, tais como o polietileno e a borracha natural (MATTOSO et al., 1996; MARTIN et al., 2009). Estes são utilizados para a fabricação de pasta celulósica para produção do papel Kraft de alta resistência e de outros tipos de papel fino, como para cigarro, filtro e absorvente higiênico (MATTOSO et al., 1996). Já na indústria automobilística as fibras de sisal são utilizadas nos estofamentos de veículos de luxo importados, pois uma das grandes vantagens do uso dessas fibras vegetais é a sua ausência de toxicidade, já que a espuma de poliuretano à base de isocianato utilizada usualmente libera durante a sua combustão o gás cianídrico, altamente tóxico (MARTIN et al., 2009). O resíduo descartado das folhas de sisal é destinado à suplementação na alimentação de animais ruminantes, adubo orgânico e para fins terapêuticos (MARTIN et al., 2009; BOTURA, 2011).

A *Agave sisalana* (Figuras 1 e 2) é uma herbácea com apenas um eixo principal, com um caule curto situado no nível do solo, no qual as folhas se inserem e armazenam água e nutrientes. As folhas são longas, rígidas, convexas e de coloração verde. Possui comprimento médio entre 90 e 160 centímetros, embora possam alcançar até dois metros (DOMINGUES, 2008; BOTURA, 2011; MIRANDA, 2011). É uma planta de ciclo perene, que floresce apenas uma vez durante seu ciclo vegetativo e essa inflorescência permanece presente até a morte da

planta, em média de 10 a 15 anos de ciclo (DOMINGUES, 2008; DEBNATH et al., 2010; BOTURA, 2011; MIRANDA, 2011).



Figura 1- *Agave sisalana* Perrine adulta.

Fonte: <http://fingoen.blogjardin.com/archive/2009/11/27/agave-sisalana.html>



Figura 2 – (A) Inflorescência, (B) Fruto maduro e (C) Corte do fruto com sementes de *Agave sisalana* (BOTURA, 2011).

Por meio de técnicas espectroscópicas, saponinas esteroidais de diferentes espécies de sisal foram identificadas estruturalmente. Da espécie *A. sisalana* foram reportados o

isolamento e a determinação das estruturas de cinco saponinas esteroidais (DING et al., 1993), sendo a hecogenina (Figura 3) o composto presente em maior abundância (DEBNATH et al., 2010; BOTURA, 2011; DUNDER et al., 2013) e encontrada em maior concentração em folhas maduras (BOTURA, 2011).

A hecogenina pode ser facilmente obtida através da hidrólise ácida ou enzimática do suco das folhas de *A. sisalana*, considerada um precursor de diversos esteroides farmacologicamente ativos, o que comprova através de evidências químicas e fitoquímicas a importância farmacológica desta planta (DING et al., 1993; DOMINGUES, 2008; BOTURA, 2011; DUNDER et al., 2013).

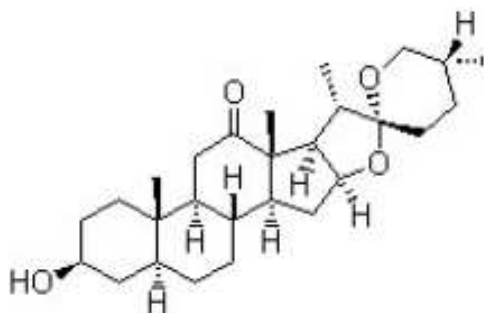


Figura 3 – Representação estrutural da hecogenina (DOMINGUES, 2008).

O interesse da indústria farmacêutica por esse grupo de substâncias tem aumentado, em decorrência das inúmeras atividades apresentadas pelas saponinas, destacando-se as atividades antifúngica e anti-inflamatória (LACAILLE-DUBOIS; WAGNER, 1996; FRANCIS et al., 2002; BOTURA, 2011; DUNDER et al., 2013). Popularmente o sisal é utilizado para o tratamento de doenças hepáticas, tuberculose e sífilis (DEBNATH et al., 2010), entretanto, devido à sua ação detergente, as saponinas são dotadas de efeito tóxico em função de sua propriedade de causar ruptura em eritrócitos, liberando hemoglobina (ODA et al., 2000; SIMÕES et al., 2010; BOTURA, 2011). Outros efeitos tóxicos ainda relacionados à

lise celular são as ações inseticida, anti-helmíntica e ictiotóxica (SCHENKEL et al., 1997; BOTURA, 2011).

A toxicidade de uma substância que apresenta atividade farmacológica deve sempre ser determinada, a fim de evitar a ocorrência de efeitos nocivos ao organismo ocasionados por intoxicação (LARINI, 1997). Neste contexto, nos estudos toxicológicos um importante fator a ser considerado é a dose que será empregada, ou seja, a quantidade do xenobiótico que será administrada a um organismo vivo (LARINI, 1997; OGA, 2003).

Considerando as diversas atividades farmacológicas desempenhadas pela espécie *A. sisalana*, em função do alto teor de saponinas, ricas em hecogenina (DING et al., 1993; DOMINGUES, 2008; DUNDER et al., 2013), torna-se necessário a realização de pesquisas direcionadas à investigação da toxicidade reprodutiva e fetal desta planta, uma vez que seu suco é utilizado na medicina popular para o tratamento de várias doenças e também suas fibras utilizadas como alimento aos animais em pequenas propriedades rurais do sertão nordestino (DOMINGUES, 2008).

### **Plantas medicinais na reprodução**

Diversos compostos sintetizados pelas plantas podem promover prejuízos nas funções dos órgãos reprodutivos, no sistema endócrino e nervoso, quando administrados de maneira indiscriminada. Nas mulheres, os efeitos mais preocupantes que envolvem o sistema reprodutor estão relacionados a irregularidades no ciclo menstrual, sangramentos durante o período gestacional e aborto, enquanto nos fetos os efeitos teratogênicos (SANTOS, 2014) e embriotóxicos são os mais preocupantes, uma vez que esses compostos podem atravessar a placenta (RODRIGUES et al., 2011; ARCANJO et al., 2013).

Existem muitas plantas na medicina popular que possuem efeito abortivo comprovado como *Angelica archangelica* (angélica), *Himathanthus sucuuba* (sucuíba), *Rosmarinus officinales* (alecrim), *Arnica Montana* (arnica), *Cinnamomum canphora* (cânfora), *Symphytum officinale* L. (confrei), *Eucaliptus globulus* (eucalipto), *Cassia angustifolia* e *Cassia acutifolia* (sene), pois são capazes de estimular a motilidade uterina (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Estudos realizados com ratas Wistar prenhes comprovaram também que plantas como *Ruta graveolens* (arruda) (GONZALES et al., 2006), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) (VITRAL; PETERS; GUERRA, 1987), *Lantana camara* (camará) (MELLO et al., 2005), *Plectranthus barbatus* (falso boldo) (ALMEIDA; LEMONICA, 2000) e *Vitis vinifera* (vidreira) (CHAN; NG, 1995), além de apresentarem efeitos prejudiciais à matriz, podem também ser tóxicas para os fetos.

Há relatos na literatura que comprovaram que o *Peumus boldus* (boldo-do-chile) demonstrou efeito teratogênico (MENGUE; MENTZ; SHENKEL, 2001) e abortivo (ALMEIDA; MELO; XAVIER 2000), enquanto o *Plectranthus barbatus* (falso boldo) quando administrado no período pré-implantação apresentou elevação na taxa de perda pré-implantacional e desenvolvimento retardado dos fetos, nas ratas tratadas com o extrato dessa planta (ALMEIDA; LEMONICA, 2000).

A *Ruta graveolens* (arruda) demonstrou efeitos embriotóxico e teratogênico comprovados em testes realizados a partir do extrato aquoso de suas folhas, durante o período pós-implantação. Já nos testes realizados com sementes de *Stryphnodendron polyphyllum* (barbatimão) em ratas prenhes, observou-se diminuição no peso dos ovários e no peso e medidas dos corpos lúteos gravídicos, além de morte embrionária (VITRAL; PETERS; GUERRA, 1987).

A planta *Artemisia vulgaris* (artemísia) quando administrada em baixa concentração, considerada insuficiente para interromper uma gestação, pode resultar em toxicidade para a gestante e para o feto (CALLIARI, 1998).

Extratos hidroalcoólicos de *Maytenus ilicifolia* (espinheira-santa) mostraram-se abortivos por atuarem no período pré-implantacional dos embriões no útero (MONTANARI; BELILACQUA, 2002) e o chá de *Baccharis genistelloides* (carqueja) é contraindicado para gestantes, em função do seu efeito abortivo (RUIZ et al., 2008).

Entre as plantas medicinais que apresentam saponinas esteroidais, destaca-se o *Korean ginseng* (ginseng), que quando administrado em ratas submetidas ao protocolo da superovulação com gonadotrofina sérica de égua prenhe, foi responsável pelo aumento da qualidade dos oócitos e redução da atresia folicular (YU et al., 2003).

Vários estudos referentes aos efeitos farmacológicos de diversas plantas medicinais são realizados, sendo que na maioria desses estudos são avaliados os efeitos das plantas sobre a embriofetotoxicidade. Estudos farmacológicos indicam que o suco obtido a partir de folhas de sisal estimula a musculatura uterina, reduz a pressão sanguínea e pode provocar aborto em fêmeas gestantes (SHARAF; ZAHRAN, 1967), entretanto não há relatos na literatura quanto ao seu possível efeito tóxico no tecido reprodutivo feminino. São escassos os relatos a respeito dos efeitos dos componentes fitoquímicos de plantas medicinais na toxicidade morfológica reprodutiva, principalmente em fêmeas (RODRIGUES et al., 2011; KUNTZE et al., 2012).

Estudos realizados por Mendes e Camargo (2012) demonstraram que os constituintes esteroidais da planta *A. sisalana* foram capazes de promover efeitos deletérios sobre o tecido gonadal masculino de ratos adultos, prejudicar a fertilidade e aumentar a taxa de perda embrionária pós-implantação. Desta forma, é importante ampliar o conhecimento dos efeitos

causados pela *A. sisalana* na estrutura tecidual dos órgãos reprodutivos e avaliar os possíveis efeitos sobre a fertilidade e produtos gestacionais de modelos animais.

## Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo avaliar se a administração do extrato por meio da hidrólise ácida (EHA) de *Agave sisalana* resulta em potencial tóxico reprodutivo em ratas, a partir da avaliação histomorfométrica dos ovários e útero e avaliação da fertilidade e parâmetros fetais.

A toxicidade reprodutiva foi investigada através das seguintes análises:

- Duração do ciclo estral e número da fase de estro durante o período experimental;
- Peso dos ovários e útero;
- Avaliação do tecido ovariano e quantificação folicular;
- Avaliação histomorfométrica uterina;
- Teste de fertilidade;
- Parâmetros fetais.

Objetivou-se também avaliar o peso dos órgãos de interesse toxicológico (coração, fígado e rins) e os sinais e sintomas clínicos nos animais.

## Referências

- ALMEIDA, F. C. G.; LEMONICA, I. P. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 1, p. 53-60, 2000.
- ALMEIDA, E. R.; MELO, A. M.; XAVIER, H. Toxicological evaluation of the hydro-alcohol extract of the dry leaves of *Peumus boldus* and boldina in rats. **Phytherapy Research**, v. 14, p. 99-102, 2000.
- ARCANJO, G. M. G. et al. Estudo da utilização de plantas medicinais com finalidade abortiva. **Revista Eletrônica de Biologia (REB)**, v. 6, n. 3, p. 234-250, 2013.
- ASSUNÇÃO, M. C. T.; DE MOURA, S. A. B. **A fitoterapia como prática na atenção básica de saúde: perspectiva de profissionais de saúde e usuários do serviço**. Campina Grande, 2009. VI Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Campina Grande- PIBIC/CNPq/UFCG.
- BOTURA, M. B. **Avaliação anti-helmíntica e toxicológica de extratos e frações do resíduo de *Agave sisalana***. Feira de Santana, 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana.
- CACTUS, SUCCULENTES ET CAUDEX. *Agave sisalana*. Disponível em: <<http://fingoen.blogjardin.com/archive/2009/11/27/agave-sisalana.html>>. Acesso em: 20 nov. 2015.
- CALLIARI, M. R. T. Effects of prenatal exposure to restraint stress and monocrotophos on behavioral and physical development in the rat. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, n. 3, p. 171-178, 1998.
- CAVALLI, V. L. L. O. et al. Avaliação in vivo do efeito hipoglicemiante de extratos obtidos da raiz e folha de bardana *Arctium minus* (Hill.) Bernh. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 64-70, 2007.
- CHAN, W. Y.; NG, T. B. Adverse effect of *Tripterygium wilfordii* extract on mouse embryonic development. **Contraception**, v. 51, p. 65-71, 1995.
- DEBNATH, M. et al. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, p. 177-187, 2010.
- DING, Y. et al. Two new steroidal saponins from dried fermented residues of leaf-juices of *Agave sisalana*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 41, p. 557-560, 1993.
- DOMINGUES, L. F. **Avaliação da atividade anti-helmíntica do resíduo líquido de *Agave sisalana* Per. (sisal) em caprinos**. Salvador, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia.

DUNDER, R. J. et al. Applications of the hexanic fraction of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm (Asparagaceae): control of inflammation and pain screening. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 263-271, 2013.

FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 587-605, 2002.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONZALES, J. R. et al. Efecto embriotóxico y teratogênico de *Ruta chalepensis* L. «ruda», en ratón (*Mus musculus*). **Revista Peruana Biología**, v. 13, n. 3, p. 223-226, 2006.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

KUNTZE, L. B. et al. Estudo comparativo dos efeitos do extrato de *Ginkgo biloba* L. e *Panax ginseng* C. A. Meyer na reprodução de ratos machos e fêmeas Wistar. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, p. 34-42, 2012.

LACAILLE-DUBOIS, M. A.; WAGNER, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. **Phytomedicine**, v. 2, p. 363-386, 1996.

LARINI, L. **Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1997.

MARTIN, A. R. et al. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. **Polímeros**, v. 19, p. 40-46, 2009.

MATTOSO, L. H. C. et al. Utilização de fibras vegetais para reforço de plástico. **EMBRAPA-CNPDIA**, 1996.

MELLO, F. B. et al. Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on general reproductive performance and teratology in rats. **Toxicon**, v. 45, n. 4, p. 459-466, 2005.

MENDES, T. B.; CAMARGO, I. C. C. **Efeitos do tratamento com extrato aquoso de sisal (*Agave sisalana*) sobre parâmetros reprodutivos de ratos adultos: avaliação da morfologia e morfometria testicular, morfologia espermática e fertilidade**. Assis, 2012. Monografia (Conclusão de Curso Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 11, p. 21-35, 2001.

MIRANDA, G. P. M. ***Agave sisalana*, o ouro verde do sertão**: O mundo do trabalho e os espaços de resistência narrados pela memória dos velhos sisaleiros do semi-árido paraibano (1970-1990). Anais do XXVI Simpósio Nacional de História – ANPUH (São Paulo), p. 1-12, 2011.

MONTANARI, T.; BEVILACQUA, E. Effect of *Maytenus ilicifolia* Mart. on pregnant mice. **Contraception**, v. 65, n. 2, p. 171-175, 2002.

ODA, K. et al. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. **Biological Chemistry**, v. 381, p. 67-74, 2000.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

QUEIROZ, S. R. D. O. D. et al. Chromosomal analysis of immature bulbs of sisal (*Agave* spp.) cultivated in different districts in Bahia, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 26, n. 4, p. 842-848, 2012.

RIBEIRO, B. D.; BARRETO, D. W.; COELHO, M. A. Z. Use of micellar extraction and cloud point preconcentration for valorization of saponins from sisal (*Agave sisalana*) waste. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 601-609, 2015.

RODRIGUES, H. G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, p. 13, n. 3, p. 359-366, 2011.

ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.

RUIZ, A. L. T. et al. Pharmacology and toxicology of *Peumus boldus* and *Baccharis genistelloides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 295-300, 2008.

SANTOS, M. C. **Avaliação do potencial tóxico reprodutivo do extrato de *Cordia ecalyculata* Vell: em ratos Wistar**. Assis, 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP.

SANTOS, R. L. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, p. 486-491, 2011.

SCHENKEL, E. P. et al. Saponins from maté (*I. paraguariensis*) and other south american *Ilex* species: ten years research on *Ilex* saponins. **Ciência e Cultura (São Paulo)**, v. 49, n. 5/6, p. 359-363, 1997.

SHARAF, A.; ZAHRAN, M. Pharmacological investigation on *Agave sisalana* Perr., with special study of its ecobolic effect. **Plant Foods for Human Nutrition (Formerly Qualitas Plantarum)**, v. 14, n. 4, p. 345-351, 1967.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2010.

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

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-313, 2008.

VITRAL, G. S. F.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. O. Mecanismos da ação embriótóxica do barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* M.). **Reprodução e Climatério**, v. 3, p. 222-226, 1987.

YU, W. J. Modulating effects of *Korean ginseng* saponins on ovarian function in immature rats. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 11, p.1574-1580, 2003.

## Capítulo Único

**International Journal of Morphology**

# **EFEITOS DO EXTRATO DE *AGAVE SISALANA* Perrine SOBRE A TOXICIDADE OVARIANA E UTERINA, FERTILIDADE E PARÂMETROS FETAIS DE RATAS**

Amanda Martins Viel<sup>a</sup>, Isabel Cristina Cherici Camargo<sup>a1</sup>

<sup>a</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras de Assis,  
Departamento de Ciências Biológicas, Avenida Dom Antônio 2100, CEP: 19806-900, Assis,  
São Paulo, Brasil.

<sup>1</sup>Autor correspondente

Tel.: +5518 33025800

E-mail: camargo@assis.unesp.br

## Resumo

A *Agave sisalana* (sisal) é popularmente utilizada na medicina tradicional para tratar diversas doenças, mas ainda não foram relatados seus possíveis efeitos colaterais na reprodução feminina. Então, o objetivo do estudo foi investigar o tecido ovariano e uterino, a fertilidade e os parâmetros fetais de ratas tratadas com o extrato obtido por meio da hidrólise ácida (EHA) de sisal (100 mg/kg de peso corpóreo). O grupo controle recebeu água destilada. O tratamento foi realizado por via oral durante 30 dias consecutivos e o ciclo estral foi monitorado diariamente. Os ovários e úteros das ratas (n= 5/grupo) foram coletados e analisados em microscopia de luz. O teste de fertilidade foi aplicado em oito ratas de cada grupo experimental. Os resultados demonstraram que o ciclo estral não foi afetado pelo tratamento com o sisal. O peso absoluto ovariano foi maior ( $p<0,05$ ) no grupo EHA, mas nenhuma alteração na estrutura histológica e na quantificação folicular foi observada, comparativamente ao grupo controle. O peso e a estrutura morfológica uterina foram similares em ambos os grupos experimentais. No entanto, a espessura do perimétrio foi maior ( $p<0,05$ ) no grupo EHA. Houve um discreto aumento ( $p<0,05$ ) no peso da ninhada no grupo EHA, mas o tamanho da ninhada foi reduzido significativamente. Concluiu-se que a *Agave sisalana* não foi gonadotóxica e não prejudicou a fertilidade, mas promoveu discreta alteração na espessura do perimétrio e afetou o peso e o tamanho da ninhada de ratas.

**Palavras-chave** Sisal, gonadotoxicidade, reprodução, fetotoxicidade.

## Introdução

Originária da península de Yukatan, no México, a planta *Agave sisalana*, popularmente conhecida como sisal (Martin *et al.*, 2009; Queiroz *et al.*, 2012) é uma monocotiledônea (Queiroz *et al.*, 2012), amplamente cultivada em território brasileiro, mais especificamente na região do Nordeste (Martin *et al.*, 2009; Botura, 2011; Queiroz *et al.*, 2012) em função do clima semiárido (Dunder *et al.*, 2013).

Saponinas esteroidais de diferentes espécies de sisal foram identificadas estruturalmente e, da espécie *A. sisalana* foram isoladas e determinadas as estruturas de cinco saponinas esteroidais (Ding *et al.*, 1993), sendo a hecogenina o composto presente em maior abundância (Debnath *et al.*, 2010; Botura, 2011; Dunder *et al.*, 2013) e facilmente obtida através da hidrólise ácida ou enzimática do suco das folhas de *A. sisalana* (Ding *et al.*, 1993; Domingues, 2008; Botura, 2011; Dunder *et al.*, 2013).

O interesse da indústria farmacêutica por esse grupo de substâncias tem aumentado em função das inúmeras atividades farmacológicas apresentadas pelas saponinas, destacando-se as atividades antifúngica e anti-inflamatória (Lacaille-Dubois & Wagner, 1996; Francis *et al.*, 2002; Botura, 2011; Dunder *et al.*, 2013). Popularmente o sisal é utilizado para o tratamento de doenças hepáticas, tuberculose e sífilis (Debnath *et al.*, 2010), entretanto, devido à sua ação detergente, as saponinas são dotadas de efeito tóxico em função de sua propriedade de causar ruptura em eritrócitos, liberando hemoglobina (Oda *et al.*, 2000; Simões *et al.*, 2010; Botura, 2011). Outros efeitos tóxicos ainda relacionados à lise celular são as ações inseticida, anti-helmíntica e ictiotóxica (Schenkel *et al.*, 1997; Botura, 2011). Estudos farmacológicos indicam que o suco obtido a partir de folhas de sisal estimula a musculatura uterina, reduz a pressão sanguínea e pode provocar aborto em fêmeas gestantes (Sharaf & Zahran, 1967).

Os efeitos colaterais de diversas plantas medicinais na reprodução geralmente são avaliados em fetos expostos *in útero* aos extratos de plantas. Porém, são escassos os relatos a respeito dos efeitos dos componentes fitoquímicos de plantas medicinais nos tecidos reprodutivos, principalmente em fêmeas (Rodrigues *et al.*, 2011; Kuntze *et al.*, 2012). Considerando as diversas atividades farmacológicas da *A. sisalana*, em função do seu alto teor de saponinas ricas em hecogenina (Ding *et al.*, 1993; Domingues, 2008; Dunder *et al.*, 2013), torna-se necessária a realização de pesquisas direcionadas à investigação da gonadotoxicidade e fetotoxicidade desta planta, uma vez que seu suco é utilizado na medicina popular para o tratamento de várias doenças e suas fibras são utilizadas como alimento aos animais, em pequenas propriedades rurais do sertão nordestino. Então, este estudo investigou o tecido ovariano e uterino, a fertilidade e os parâmetros fetais de ratas tratadas com o extrato obtido por meio da hidrólise ácida (EHA) de *Agave sisalana* (sisal).

## **Materiais e Métodos**

### **Animais**

Foram utilizadas ratas albinas da linhagem Wistar, com peso médio de 260 gramas e 70 dias de idade, as quais foram mantidas no Biotério Central da Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP (Assis, São Paulo, Brasil). As fêmeas foram alojadas em ambiente padrão, com temperatura controlada ( $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), sistema de exaustão de ar, luminosidade com ciclo claro/escuro de 12 horas e receberam água e dieta comercial *ad libitum*. O manejo dos animais obedeceu às normas éticas adotadas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA (Registro 005/ 2013).

### **Preparação do extrato por meio da hidrólise ácida (EHA) de *Agave sisalana***

O suco bruto de sisal foi obtido por meio da prensagem e filtração da mucilagem, resultante do processo de desfibramento de suas folhas. A mucilagem foi fornecida pelos produtores rurais do município de Valente (Bahia, Brasil), definidos pela Secretaria da Ciência, Tecnologia e Inovação da Bahia.

O extrato obtido a partir do suco natural de sisal foi submetido ao ácido sulfúrico até obtenção do pH 0,4-0,8 em alta temperatura (127°C). Posteriormente foram separados os cristais formados por centrifugação e secos a 70°C até peso constante, conforme descrito por Gouveia *et al.* (2010), com modificações. Finalmente, o extrato foi diluído em água destilada, na concentração de 100 mg/kg de peso corpóreo.

### **Análise fitoquímica do EHA de *Agave sisalana***

O EHA de sisal foi submetido a uma série de reações para caracterização dos diferentes grupos de substâncias vegetais presentes: alcaloides (reativos de Dragendorff, Mayer, Bertrand e Bouchardat), antraquinonas (reação de Bornträger), cumarinas (método de fluorescência sob luz ultravioleta), flavonoides (fluorescência sob luz ultravioleta), saponinas (teste de espuma-agitação e análise espectrofotométrica) e taninos (testes de coloração/precipitação e reação de Stiasny). As metodologias basearam-se em relatos prévios de Harbone (1973); Glasl (1983); Auterhoff & Kovar (1985); Collins & Braga (1988); Hatano *et al.*, (1989); List & Schmidt (1989); Cordell (1995); Bacchi (1996); Banskota *et al.*, (2000); Vigo *et al.*, (2003) e Simões *et al.*, (2010). A análise fitoquímica do EHA de *Agave sisalana* apresentou resultados positivos para presença de cumarinas, saponinas e flavonoides.

## **Grupos Experimentais**

As fêmeas foram pesadas e aleatoriamente distribuídas em dois grupos experimentais (n= 13/grupo): Controle (água destilada, via oral, gavage) e tratado com sisal (EHA, 100 mg/kg de peso corpóreo, via oral, gavage).

Estudos preliminares (Palacios *et al.*, 2013) demonstraram que a concentração de 100 mg/kg de peso corpóreo do extrato obtido por meio da hidrólise ácida de *Agave sisalana* apresentou propriedades anti-inflamatórias. Desta forma, a escolha do tipo de extrato e a dose de sisal empregadas no presente estudo foram baseadas no relato prévio.

Os tratamentos foram realizados por meio de uma única dose diária, durante 30 dias consecutivos. A primeira dose foi empregada nas fêmeas na fase de estro do ciclo estral. Essas fêmeas foram pesadas em dias alternados, para manutenção da dose administrada durante o período de tratamento.

## **Ciclo estral**

O ciclo estral foi monitorado diariamente, por meio da técnica de lavado vaginal (Marcondes *et al.*, 2002). As fases correspondentes do ciclo foram identificadas de acordo com Thrower & Lim (1981), a partir dos tipos celulares descamados.

## **Eutanásia das fêmeas e coleta dos órgãos**

Ao final do período experimental, cinco ratas de cada grupo foram pesadas e eutanasiadas na fase de estro do ciclo estral, empregando-se uma dose excessiva do anestésico

Tiopental sódico (Thiopentax<sup>®</sup>, Cristália, São Paulo, Brasil), via intraperitoneal. Os ovários, útero e os órgãos de interesse toxicológico (coração, fígado e rins) foram coletados e pesados.

### **Rotina histológica**

Os ovários e cornos uterinos de cada fêmea foram processados através da rotina histológica usual e incluídos em Paraplast (Oxford Labware, St. Louis - USA). Secções semisseriadas de 5 µm de espessura foram coradas pela técnica de Hematoxilina - Eosina (HE) para análise histomorfométrica em microscopia de luz.

### **Análise ovariana e uterina**

A análise histomorfométrica dos tecidos reprodutivos foi realizada em microscópio Zeiss Axio Scope A1, acoplado ao sistema de captura de imagens com o programa Axio Vision, versão 4.7.2.

A identificação de cada classe de folículo baseou-se na descrição de Hirshfield (1991), como segue: Classe I (pequenos folículos pré-antrais; < 90µm); Classe II (grandes folículos pré-antrais; 91-260 µm); Classe III (pequenos folículos antrais; 261-350 µm); Classe IV (folículos antrais de tamanho médio; 351-430 µm); Classe V (grandes folículos antrais; 431-490 µm); Classe VI (folículos maduros ou Graafianos; > 491 µm).

Os folículos atrésicos foram quantificados e classificados com base no seguinte grau de regressão (Osman, 1985), como segue: Estágio IA (picnose em algumas células granulosas); Estágio IB (alterações degenerativas em toda a camada granulosa); Estágio IIA (oócitos com núcleo picnótico, meiose bloqueada em metáfase I, pseudomaturação e degeneração de células do *cumulus*); Estágio IIB (caracterizado pela presença de oócito

flutuante no antro com poucos corpos picnóticos). Finalmente, foram obtidos o número e mensuração da área dos corpos lúteos.

Nos cornos uterinos, em cada uma das secções semisseriadas da porção medial foram mensuradas a altura do epitélio luminal e espessura do estroma endometrial, miométrio e perimétrio.

A análise morfométrica nos ovários e útero foi realizada em 5 secções semisseriadas de cada rata, em cada grupo experimental.

### **Avaliação dos parâmetros fetais**

Ao final do tratamento oito fêmeas restantes de cada grupo foram acasaladas com machos não tratados (1 macho: 2 fêmeas), no final da tarde do primeiro proestro. Na manhã seguinte, a presença de espermatozoides no lavado vaginal foi considerado o 1º dia de gestação (DG1). O peso corpóreo das matrizes foi registrado nos dias gestacionais 1, 7, 14 e 19. No DG19 foi realizada a laparotomia, posteriormente à sedação das matrizes com uma dose excessiva do anestésico Tiopental sódico, via intraperitoneal. Os cornos uterinos gravídicos e ovários foram expostos e posteriormente obtiveram-se os seguintes registros: número de implantes, número de corpos lúteos gravídicos, número de fetos vivos na ninhada, número de reabsorções e número de placentas. Os pesos da ninhada e das placentas foram obtidos.

Foram calculadas as taxas de perda pré-implantacional  $[(n^\circ \text{ de corpos lúteos} - n^\circ \text{ de implantes} / n^\circ \text{ de corpos lúteos}) \times 100]$ , perda pós-implantacional  $[(n^\circ \text{ de implantes} - n^\circ \text{ de fetos} / n^\circ \text{ de implantes}) \times 100]$ , taxa de fertilidade  $[(n^\circ \text{ de fêmeas com gametas no esfregaço} / n^\circ \text{ de fêmeas acasaladas}) \times 100]$ , taxa de gestação  $[(n^\circ \text{ de fêmeas com fetos viáveis} / n^\circ \text{ de fêmeas acasaladas})]$ .

Os fetos foram analisados conforme sua morfologia externa (cabeça, tronco e membros) a partir do uso de estereomicroscópio (Carl Zeiss, Citoval 2, Alemanha).

### **Análise estatística**

Os dados foram analisados através da análise de variância paramétrica ANOVA, complementados com o Teste t-Student. Na ausência de normalidade dos dados foi utilizada a análise de variância não paramétrica de Mann-Whitney. O nível de significância foi estabelecido para  $p < 0,05$ .

### **Resultados**

#### ***Ciclo estral***

O EHA de sisal não afetou o ciclo estral das fêmeas já que a duração do ciclo estral e o número de estros foram similares ( $p > 0,05$ ) em ambos os grupos, durante o período de tratamento (Tabela 1).

**Tabela I.** Duração do ciclo estral e número da fase de estro durante o período experimental nas fêmeas dos grupos controle e tratado com sisal (EHA).

| Parâmetros                           | Grupos Experimentais (n= 13/grupo) |              |
|--------------------------------------|------------------------------------|--------------|
|                                      | Controle                           | EHA          |
| Duração do ciclo (dias)              | 4,43 ± 0,64                        | 4,36 ± 00,41 |
| Número da fase de estro <sup>a</sup> | 7 ± 1                              | 8 ± 1        |

Nenhuma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos. Mann-Whitney (valores expressos como mediana ± desvio interquartilico). <sup>a</sup>Teste t-Student (valores expressos como média ± desvio padrão).

### ***Peso das estruturas orgânicas***

O peso absoluto dos ovários foi maior ( $p < 0,05$ ) no grupo EHA, mas o peso relativo gonadal foi similar nos grupos controle e EHA (Tabela 2). Os pesos absoluto e relativo do útero não foram alterados significativamente pelo tratamento com o EHA de sisal. Os órgãos de interesse toxicológico (coração, fígado e rins) apresentaram peso absoluto e relativo similares ( $p > 0,05$ ) em ambos os grupos.

**Tabela II.** Peso absoluto (g) e relativo (g%) dos ovários, útero, coração, fígado e rins nas fêmeas dos grupos controle e tratado com sisal (EHA).

| Parâmetros     |                    | Grupos Experimentais (n= 5/grupo) |              |
|----------------|--------------------|-----------------------------------|--------------|
|                |                    | Controle                          | EHA          |
| <b>Ovários</b> | Peso Absoluto (g)  | 0,11 ± 0,01                       | 0,14 ± 0,03* |
|                | Peso Relativo (g%) | 0,04 ± 0,005                      | 0,04 ± 0,01  |
| <b>Útero</b>   | Peso Absoluto (g)  | 0,41 ± 0,09                       | 0,43 ± 0,07  |
|                | Peso Relativo (g%) | 0,16 ± 0,04                       | 0,1 ± 0,09   |
| <b>Coração</b> | Peso Absoluto (g)  | 0,84 ± 0,06                       | 0,89 ± 0,06  |
|                | Peso Relativo (g%) | 0,33 ± 0,04                       | 0,31 ± 0,03  |
| <b>Fígado</b>  | Peso Absoluto (g)  | 9,42 ± 0,70                       | 10,88 ± 2,20 |
|                | Peso Relativo (g%) | 3,74 ± 0,38                       | 3,75 ± 0,17  |
| <b>Rins</b>    | Peso Absoluto (g)  | 1,88 ± 0,07                       | 1,93 ± 0,30  |
|                | Peso Relativo (g%) | 0,75 ± 0,08                       | 0,67 ± 0,10  |

\* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle. Teste t-Student (valores expressos como média ± desvio padrão).

### ***Análise histológica ovariana***

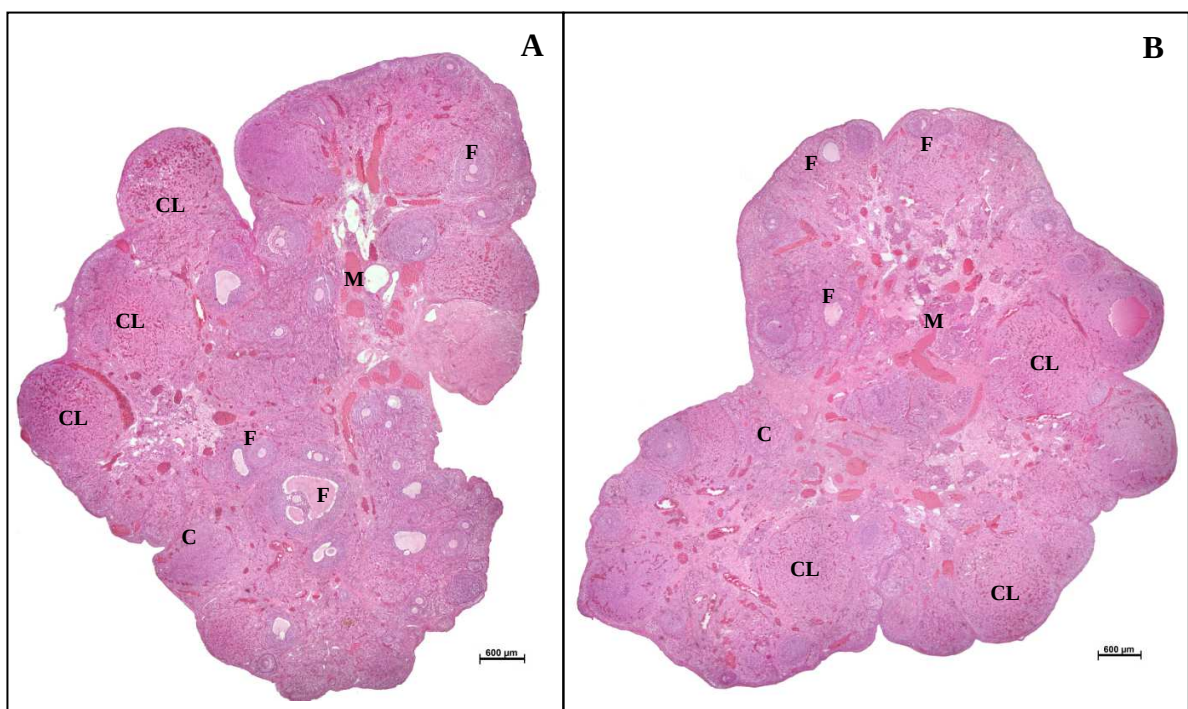
Em ambos os grupos experimentais (Figura 1A, B), os ovários apresentaram regiões cortical e medular distintas, respectivamente caracterizadas por um tecido fibrocelular

contendo folículos em diversos estágios de desenvolvimento e degeneração, e por um tecido predominantemente frouxo e vascularizado. Corpos lúteos estavam presentes no estroma ovariano dos grupos controle e EHA.

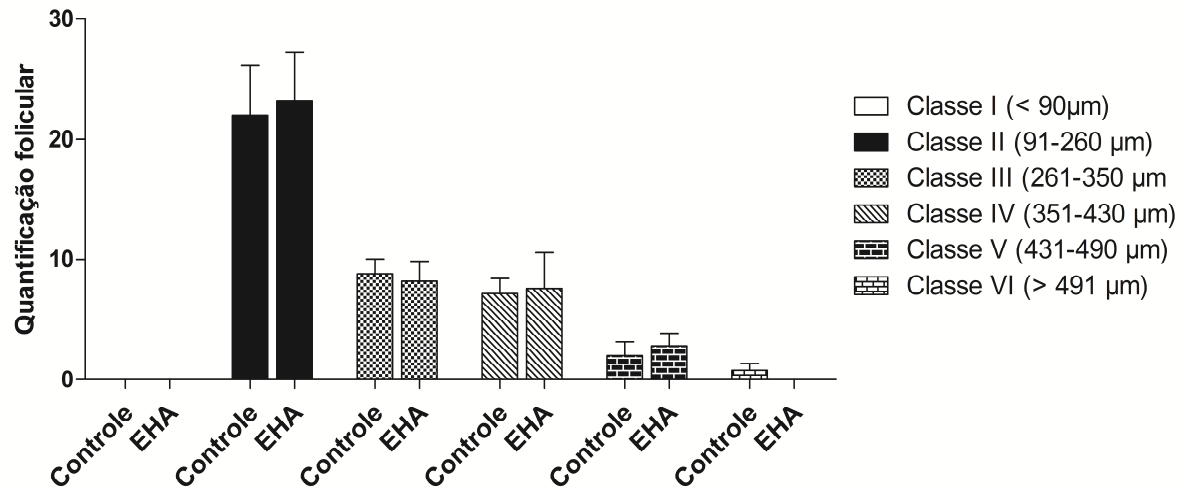
A frequência de folículos saudáveis em cada classe de desenvolvimento (Figura 2) foi semelhante ( $p>0,05$ ) em ambos os grupos, com predomínio de grandes folículos pré-antrais (Classe II). Os folículos da Classe VI ( $>491\ \mu\text{m}$ ) estavam presentes somente no grupo controle.

A quantidade de folículos atrésicos nos diferentes estágios de degeneração foi similar ( $p>0,05$ ) em ambos os grupos (Figura 3), com predomínio de folículos em estágio avançado de atresia.

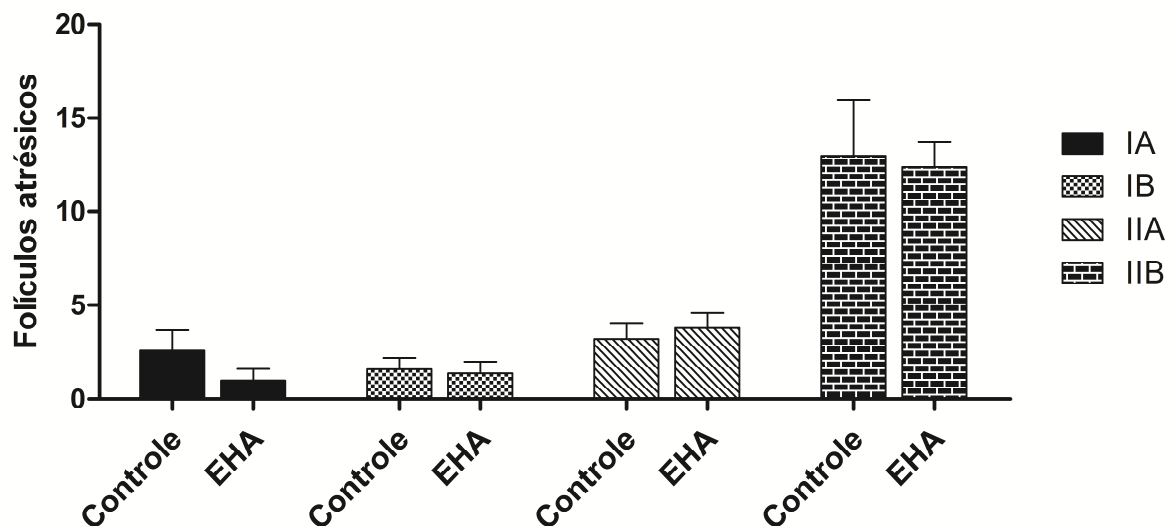
O número e a área de corpos lúteos nos ovários das fêmeas não foram afetados significativamente ( $p>0,05$ ) pelo tratamento com o EHA de *Agave sisalana* (Tabela 3).



**Figura 1.** Secções histológicas dos ovários de ratas do grupo controle (A) e grupo EHA (B). Observar a similaridade do tecido em ambos os grupos. São mostrados: unidades foliculares (F), corpos lúteos (CL), medula (M), córtex (C). HE, barras= 600  $\mu$ m.



**Figura 2.** Quantificação folicular ovariana nos diferentes estágios de maturação, nos grupos controle e tratado com sisal (EHA). (n= 5 secções/ ovário/ fêmea/ grupo).



**Figura 3.** Quantificação de folículos nos diferentes estágios de degeneração, nos grupos controle e tratado com sisal (EHA). (n= 5 secções/ ovário/ fêmea/ grupo).

**Tabela III.** Número e área (mm<sup>2</sup>) dos corpos lúteos nos ovários das fêmeas de cada grupo experimental.

| Parâmetros                          | Grupos Experimentais (n= 5/grupo) |                 |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
|                                     | Controle                          | EHA             |
| Número de corpos lúteos             | 10,00 ± 3,87                      | 12,50 ± 4,92    |
| Área dos corpos lúteos <sup>a</sup> | 290,10 ± 249,66                   | 282,44 ± 253,59 |

Nenhuma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os grupos. Mann-Whitney (valores expressos como mediana ± desvio interquartilico). <sup>a</sup>Teste t-Student (valores expressos como média ± desvio padrão).

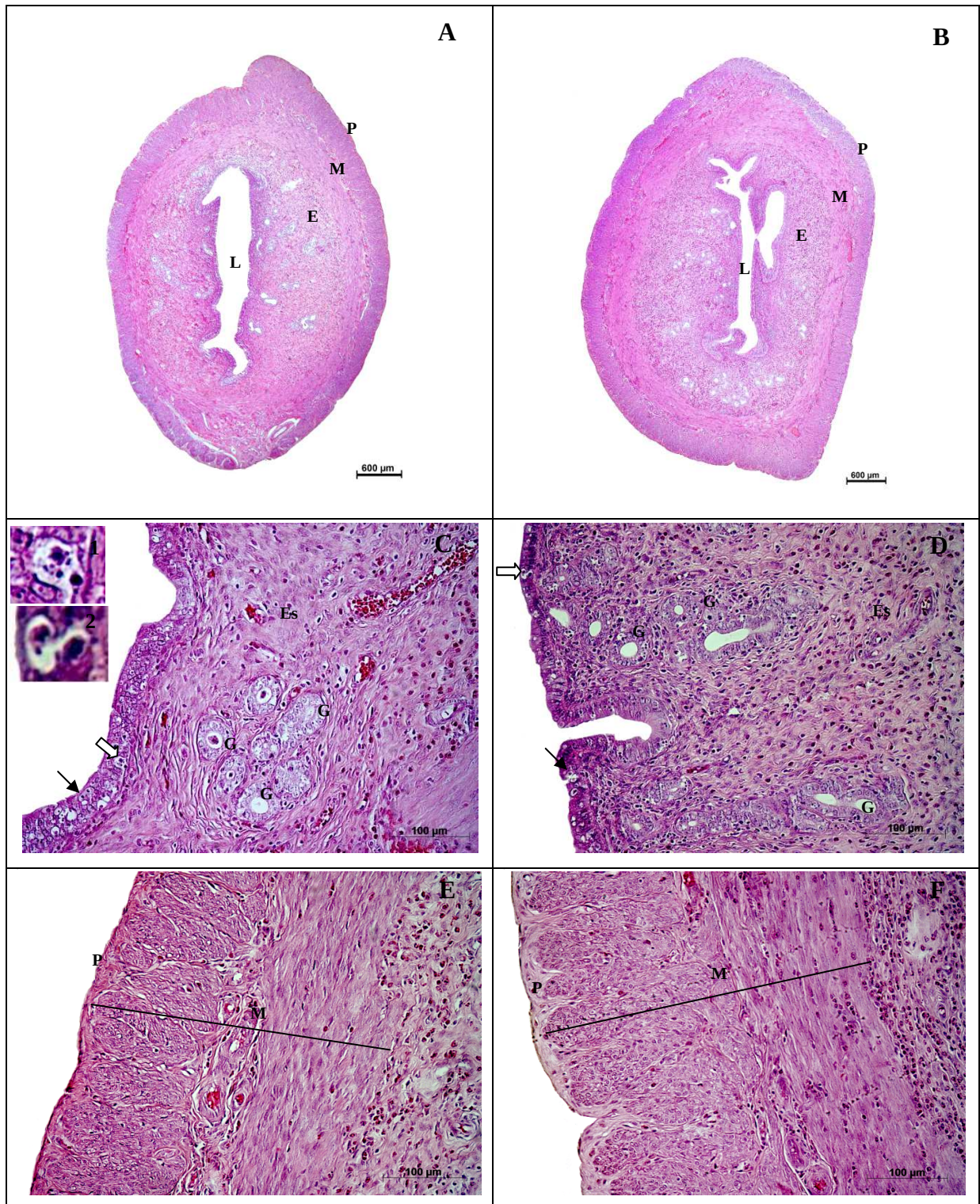
### **Análise histológica uterina**

O tecido uterino demonstrou características similares no endométrio, miométrio e perimétrio entre os grupos experimentais (Figura 4A, B). O endométrio caracterizou-se por revestimento luminal do tipo colunar alto, com a presença de vacúolos secretores, acompanhado de algumas áreas com aparência de degeneração/necrose celular (Figura 4C, D). O estroma endometrial, constituído de tecido conjuntivo predominantemente celular apresentou leucócitos dispersos por todo tecido e glândulas de aspecto tubular, as quais em secções transversais aparecem revestidas por epitélio cúbico simples, com algumas células necróticas e com a presença de secreção luminal constituída predominantemente por células do sistema imune (Figura 4C, D).

A camada do miométrio (Figura 4E, F) apresentou citoarquitetura bem definida, com fibras musculares lisas dispostas longitudinalmente na porção externa e dispostas circularmente na porção interna. Entre as fibras musculares o tecido conjuntivo mostrou-se vascularizado e com leucócitos dispersos. O perimétrio apresentou-se constituído por células pavimentosas simples e tecido fibroso subjacente, com algumas células do sistema imune.

A análise morfométrica uterina demonstrou que não houve alterações ( $p > 0,05$ ) na espessura do epitélio luminal, estroma endometrial e miométrio entre os grupos experimentais

(Tabela 4), no entanto, a espessura do perimétrio foi maior ( $p<0,05$ ) no grupo EHA em comparação ao grupo controle.



**Figura 4.** Secções histológicas do útero de ratas do grupo controle (A, C, E) e grupo EHA (B, D, F). Observar as características semelhantes em ambos os grupos. São mostrados: cavidade luminal (L), endométrio (E), miométrio (M), perimetrio (P), estroma endometrial (Es), glândulas (G), vacúolos secretores (setas pretas; destaque em C1), células em degeneração (setas vazadas; destaque em C2). HE.

**Tabela IV.** Espessura (em  $\mu\text{m}$ ) do epitélio luminal e estroma endometrial, miométrio e perimétrio nos grupos controle e tratado com sisal (EHA).

| Parâmetros                          | Grupos Experimentais (n= 5/grupo) |                     |
|-------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
|                                     | Controle                          | EHA                 |
| <b>Epitélio Luminal<sup>a</sup></b> | 34,78 $\pm$ 7,87                  | 36,48 $\pm$ 7,16    |
| <b>Estroma endometrial</b>          | 686,03 $\pm$ 236,19               | 707,75 $\pm$ 173,92 |
| <b>Miométrio</b>                    | 361,12 $\pm$ 149,44               | 373,56 $\pm$ 82,02  |
| <b>Perimétrio</b>                   | 27,65 $\pm$ 5,00                  | 30,17 $\pm$ 5,38*   |

\*p<0,05 na comparação com o grupo controle. <sup>a</sup>Teste t-Student (valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão). Teste de Mann-Whitney (valores expressos como mediana  $\pm$  desvio interquartilico). (n= 5 secções/ ovário/ fêmea/ grupo).

#### ***Análise da fertilidade e dos parâmetros fetais***

As taxas de fertilidade e gestação foram similares em ambos os grupos (Tabela 5). Houve um discreto aumento (p<0,05) no peso da ninhada no grupo EHA em comparação com o grupo controle. No entanto, o tamanho da ninhada foi menor (p<0,05) no grupo tratado com o sisal. O peso das placentas aumentou significativamente (p<0,05) no grupo EHA. O peso corpóreo das matrizes, peso do útero gravídico e as taxas de perda pré e pós-implantação não foram afetados (p>0,05) pelo tratamento com EHA.

O tratamento materno com o EHA de *Agave sisalana* não promoveu anormalidades morfológicas externas fetais.

**Tabela V.** Parâmetros maternos e fetais nos grupos controle e tratadas com sisal (EHA).

| Parâmetros                                   | Grupos Experimentais (n= 8/grupo) |                |
|----------------------------------------------|-----------------------------------|----------------|
|                                              | Controle                          | EHA            |
| Taxa de gestação (%)                         | 100                               | 100            |
| Taxa de fertilidade (%)                      | 100                               | 100            |
| <b>Peso corpóreo da matriz (g)</b>           |                                   |                |
| DG1 <sup>a</sup>                             | 277,00 ± 17,00                    | 265,50 ± 32,50 |
| DG7 <sup>a</sup>                             | 298,50 ± 13,25                    | 288,00 ± 36,25 |
| DG14                                         | 336,62 ± 33,07                    | 317,00 ± 22,95 |
| DG19                                         | 379,00 ± 34,78                    | 359,75 ± 36,38 |
| <b>Peso absoluto do útero gravídico (g)</b>  | 41,22 ± 3,72                      | 37,93 ± 4,68   |
| <b>Peso relativo do útero gravídico (g%)</b> | 10,97 ± 1,20                      | 10,57 ± 1,22   |
| <b>Peso das placentas (g)<sup>a</sup></b>    | 0,45 ± 0,07                       | 0,47 ± 0,11*   |
| <b>Tamanho da ninhada<sup>a</sup></b>        | 12 ± 0,50                         | 10 ± 1,25*     |
| <b>Peso da ninhada<sup>a</sup></b>           | 1.50 ± 0,19                       | 1.58 ± 0,17*   |
| <b>Perda pré-implantação (%)</b>             | 0                                 | 0              |
| <b>Perda pós-implantação (%)</b>             | 0 - 7,27                          | 0 - 9,31       |

\*p<0,05 na comparação com o grupo controle. <sup>a</sup>Teste de Mann-Whitney (valores expressos como mediana ± desvio interquartilico). Teste t-Student (valores expressos como média ± desvio padrão). DG = dia gestacional.

## Discussão

No presente estudo foi avaliado o potencial tóxico de *Agave sisalana* em fêmeas, através da administração do extrato obtido por meio da hidrólise ácida, com ênfase aos possíveis efeitos no tecido reprodutivo (ovários e útero) e nos produtos gestacionais. A toxicidade reprodutiva é definida como os efeitos tóxicos causados por substâncias exógenas de origem natural ou sintética, que atua no sistema reprodutivo alterando processos biológicos como a ovulação e a espermatogênese (Yang *et al.*, 2015). Em estudo prévio realizado em nosso laboratório (Mendes & Camargo, 2010) verificou-se que o mesmo tipo de extrato de *Agave sisalana* promoveu efeitos deletérios no tecido testicular e houve prejuízo na fertilidade

e na taxa de perda embrionária pós-implantação. Então, fez-se necessária a investigação dos possíveis efeitos tóxicos da planta na reprodução feminina.

Diversos trabalhos científicos com plantas medicinais que possuem saponinas esteroidais são alvos de estudos na área da toxicologia reprodutiva, em função das várias atividades farmacológicas desempenhadas por esses compostos (Gobbo-Neto & Lopes, 2007). No entanto, não há relatos na literatura sobre os possíveis efeitos colaterais da *Agave sisalana* na reprodução feminina.

A regularidade no ciclo estral é um importante indicativo para a avaliação do equilíbrio existente entre o eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Sendo assim, a avaliação do ciclo estral é uma importante ferramenta metodológica para a investigação dos efeitos de agentes toxicantes na reprodução. Neste estudo, as fêmeas que receberam o EHA de sisal apresentaram a duração do ciclo estral e o número da fase de estro (fase ovulatória) semelhantes às do grupo controle. Embora não tenha sido realizada a dosagem hormonal, podemos inferir que os níveis dos hormônios gonadotróficos hipofisários (FSH e LH) e hormônios esteroidais ovarianos (estrógeno e progesterona) não foram influenciados pelo tratamento com o sisal.

O ovário pode ser considerado um conjunto de três tecidos endócrinos, o estroma, o folículo e o corpo lúteo. Os pesos totais destes tecidos constituem o peso líquido desta gônada (Shivalingappa *et al.*, 2002). O tratamento com sisal promoveu discreto aumento no peso absoluto dos ovários, mesmo sem a constatação de quaisquer efeitos no tecido gonadal, na quantificação de folículos antrais saudáveis e no número de folículos atresícos e corpos lúteos. Estudos prévios em fêmeas tratadas com *Panax ginseng* (Kuntze *et al.*, 2012) e *Korean ginseng* (Yu *et al.*, 2003), que são plantas ricas em saponinas, o peso ovariano das ratas não foi alterado. Não foram obtidos na literatura trabalhos que avaliassem os efeitos de plantas ricas em saponinas na estrutura histológica gonadal de fêmeas. Então, o presente

estudo traz uma contribuição na área reprodutiva e farmacológica, com evidência de ausência de efeitos tóxicos promovidos pela *Agave sisalana* no tecido ovariano.

Quanto à avaliação dos efeitos do EHA de sisal no útero, verificou-se que o peso absoluto e relativo do órgão não foi afetado pelo tratamento, assim como a estrutura histomorfométrica do endométrio e miométrio. Interessantemente houve um aumento significativo na espessura do perimétrio. Esta camada histológica não é geralmente susceptível a alterações morfológicas promovidas por substâncias endógenas sintéticas ou naturais e não sofre alterações durante as diferentes fases do ciclo estral. O resultado obtido pode ser atribuído ao aparente aumento na quantidade de fibras colágenas inseridas nesta camada externa do útero, observada na análise microscópica. A ação de saponinas nas diferentes camadas do tecido uterino devem ser melhores investigadas e os estudos devem ser ampliados.

Trabalhos prévios que avaliaram os efeitos de plantas ricas em saponinas esteroidais no tecido uterino de vários animais mostraram que, camundongos tratados com *Cortex albiziae* apresentaram espessamento significativo no epitélio luminal (Yang *et al.*, 2015), enquanto ratas que receberam extrato de *Aspilia africana*, apresentaram um desarranjo nas células do estroma do endométrio e perda da linha epitelial (Oluyemi *et al.*, 2015),

A regularidade do ciclo estral nas fêmeas tratadas com o sisal e a presença de corpo lúteo no ovário demonstrou que ocorreu a ovulação. As taxas de fertilidade e gestação foram semelhantes em ambos os grupos, e o tratamento com o EHA de sisal mostrou que a capacidade reprodutiva das ratas não foi comprometida.

Na avaliação dos parâmetros fetais verificou-se que o extrato, na dose de 100 mg/kg, administrado no período pré-concepção, reduziu o tamanho da ninhada, e aumentou o peso das placentas e o peso da ninhada. Embora o número de fetos tenha sido reduzido, nenhuma alteração significativa foi observada nas perdas embrionárias pré e pós-implantação. O

aumento do fluxo sanguíneo da unidade uteroplacentária durante o período de gestação (Brolio *et al.*, 2010) pode ter contribuído com o aumento no peso das placentas no grupo EHA, e consequentemente aumento no peso fetal. Uma das principais funções da placenta dos mamíferos é a de assegurar uma nutrição fetal, durante todo o período gestacional (Gudmundsson *et al.*, 2009; Riquelme, 2009). Isto envolve a transmissão de nutrientes, gases e água para o feto, bem como a excreção de resíduos de produtos de metabolismo fetal no sangue materno (Cetin & Alvino, 2009). Brolio *et al.* (2010) relataram diferenças significativas nos pesos dos fetos ao nascer e ao desmame, em porcas que receberam durante a fase gestacional dieta alimentar com *Yucca schidigera*, que apresenta alto teor de saponinas. Segundo os autores, as saponinas presentes na *Yucca schidigera* diminuem a amônia intestinal, reduzindo a demanda de oxigênio do tecido, permitindo maior fluxo de oxigênio aos fetos até o nascimento.

A alteração no peso de estruturas orgânicas é um importante indicativo de toxicidade promovida por agentes de origem natural ou sintética. Neste estudo, o EHA de *Agave sisalana* não promoveu alterações no peso dos órgãos de interesse toxicológico, coração, fígado e rins. Este resultado pôde ser confirmado por meio da ausência de sintomas (alterações no comportamento, piloereção, tremores e morte) e sinais (alterações no peso) clínicos de toxicidade nas fêmeas, durante o período experimental.

## **Conclusões**

Concluiu-se que a administração do EHA de *Agave sisalana* não apresentou efeito gonadotóxico e não alterou as características morfológicas do tecido uterino. Porém, a utilização desta planta medicinal pela população feminina deve ser vista com cautela, haja vista que o extrato de sisal, administrado no período de pré-concepção, na dose de 100 mg/kg,

promoveu fetotoxicidade caracterizada pelo aumento no peso fetal e redução no tamanho da ninhada.

## Referências

- Auterhoff, H. & Kovar, K.-A. Identifizierung von Arzneistoffen. 5 ed. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1985.
- Bacchi, E. M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: Di Stasi, L. C. (org.). Plantas Medicinais: Arte e ciência. São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1996. p. 169-197.
- Banskota, A. H.; Tezuka, Y.; Adnyana, I. K.; Midorikawa, K.; Matsushige, K.; Message, D.; Huertas, A. A. G. & Kadota, S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J. Ethnopharmacol*, 72: 239-246, 2000.
- Botura, M. B. Avaliação anti-helmíntica e toxicológica de extratos e frações do resíduo de *Agave sisalana*. Feira de Santana, 2011. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, 2011.
- Brolio, M. P.; Ambrósio, C. E.; Francioli, A. R.; Morini, A. C.; Guerra, R. R. & Miglino, M. A. A barreira placentária e sua função de transferência nutricional. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 34:222-32, 2010.
- Cetin, I. & Alvino, G. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport: a review. *Placenta*, 30(Suppl):77-82, 2009.
- Collins, C. H. & Braga, G. L. Introdução a métodos cromatográficos. 3 ed. Campinas: Unicamp, 1988.
- Cordell, G. A. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry*, 40(6): 1585-1612, 1995.
- Debnath, M.; Mukeshwar, P.; Sharma, R.; Thakur, G. S. & Lal, P. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. *J. Med. Plants Res.*, 4:177-87, 2010.
- Ding, Y.; Tian, R. H.; Yang, C. R.; Chen, Y. Y. & Nohara, T. Two new steroidal saponins from dried fermented residues of leaf-juices of *Agave sisalana*. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, 41: 557-60, 1993.
- Domingues, L. F. Avaliação da atividade anti-helmíntica do resíduo líquido de *Agave sisalana* Per. (sisal) em caprinos. Salvador, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal nos Trópicos) – Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, 2008.
- Dunder, R. J.; Luiz-Ferreira, A.; Almeida, A. C. A. D.; de-Faria, F. M.; Takayama, C.; Socca, E. A. R.; Salvador, M. J.; Mello, G. C.; Santos, C.; Oliva-Neto, P. & Souza-Brito, A. R. M.

Applications of the hexanic fraction of *Agave sisalana* Perrine ex Engelm (Asparagaceae): control of inflammation and pain screening. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 108:263-71, 2013.

Fernandes, E. S.; Pinto, R. M.; de Paula Reis, J. E.; de Oliveira Guerra, M. & Peters, V. M. Effects of *Ginkgo biloba* extract on the embryo-fetal development in Wistar rats. *Birth Defects Res.*, 89(Part B):133-38, 2010.

Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H. P. & Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.*, 88:587-605, 2002.

Glasl, H. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung - 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 123:1979-1987, 1983.

Gobbo-Neto, L. & Lopes, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nova*, 30(2):374-81, 2007.

Gouveia, E. R.; Nascimento, R. D.; Souto-Maior, A. M. & Rocha, G. D. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Quim. Nova*, 32(6): 1500-03, 2009.

Gudmundsson, S.; Dubiel, M. & Sladkevicius P. Placental morphologic and functional imaging in high-risk pregnancies. *Semin. Perinatol.*, 33:270-80, 2009.

Hatano, T.; Edamatsu, R.; Mori, A.; Fujita, Y.; Yasuhara, T.; Yoshida, T. & Okuda, T. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull*, 37: 2016-2021, 1989.

Harbone, J. B. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. 2 ed. London: Chapman and Hall, 1973.

Hirshfield, N. A. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.*, 124:43-101, 1991.

Kuntze, L. B.; Kondo, A. K.; Bezerra, B. T. S.; Pinto, T. & Camargo, I. C. C. Estudo comparativo dos efeitos do extrato de *Ginkgo biloba* L. e *Panax ginseng* C. A. Meyer na reprodução de ratos machos e fêmeas Wistar. *Rev. Bras. Plantas Med.*, 14:34-42, 2012.

Lacaille-Dubois M. A. & Wagner, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, 2:363-86, 1996.

List, P. H. & Schmidt, P. C. Phytopharmaceutical technology. 1 ed. London: Heyden, 1989.

Marcondes, F. K.; Bianchi, F. J. & Tanno, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.*, 62:609-14, 2002.

Martin, A. R.; Martins, M. A.; Mattoso, L. H. & Silva, O. R. R. F. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. *Polímeros*, 19:40-6, 2009.

Mendes, T. B. & Camargo, I. C. C. Efeitos do tratamento com extrato aquoso de sisal (*Agave sisalana*) sobre parâmetros reprodutivos de ratos adultos: avaliação da morfologia e morfometria testicular, morfologia espermática e fertilidade. Assis, 2012. Monografia (Conclusão de Curso Ciências Biológicas) – Faculdade de Ciências e Letras de Assis, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, 2012.

Oda, K.; Matsuda, H.; Murakami, T.; Katayama, S.; Ohgitani, T. & Yoshikawa, M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.*, 381:67-74, 2000.

Oluyemi K. A.; Okwuonu U. C.; Baxter D. Grillo & Oyesola T. O. Toxic effects of methanolic extract of *Aspilia africana* leaf on the estrous cycle and uterine tissues of Wistar rats. *Int. J. Morphol.*, 25(3):609-614, 2007.

Osman, P. Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. *J. Reprod. Fertil.*, 73:261-70, 1985.

Palacios, J. L.; Quinta, A. R. M.; Kuruiwa, D. & Santos, L. Potencial anti-inflamatório e fitoquímico dos extratos de agave sisalana. In: XXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2013, Assis. XXV Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2013.

Queiroz, S. R. D. O. D.; Ortolani, F. A.; Mataqueiro, M. F.; Osuna, J. T. A. & Moro, J. R. Chromosomal analysis of immature bulbs of sisal (*Agave* spp.) cultivated in different districts in Bahia, Brazil. *Acta Bot. Bras.*, 26(4):842-48, 2012.

Riquelme, G. Placental chloride channels: a review. *Placenta*, 30:659-69, 2009.

Rodrigues, H. G.; Meireles, C. G.; Lima, J. T. S.; Toledo, G. P.; Cardoso, J. L. & Gomes, S. L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. *Rev. Bras. Plantas Med.*, 13(3):359-66, 2011.

Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Montanha, J. A.; Heizmann, B. M.; Athayde, M. L.; Taketa, A. T. C.; Pires, V. S. & Guillaume, D. Saponins from maté (*I. paraguariensis*) and other south american *Ilex* species: ten years research on *Ilex* saponins. *Ciê. Cult. (São Paulo)*, 49(5/6):359-63, 1997.

Sharaf, A. & Zahran, M. Pharmacological investigation on *Agave sisalana* Perr., with special study of its ecobolic effect. *Plant Foods Hum. Nutr. (Formerly Qualitas Plantarum)*, 14(4):345-51, 1967.

Shivalingappa, H.; Satyanarayan, N. D.; Purohit, M. G.; Sharanabasappa, A. & Patil, S. B. Effect of ethanol extract of *Rivea hypocrateriformis* on the estrous cycle of the rat. *J. Ethnopharmacol.*, 82(1):11-7, 2002.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A. & Petrovick, P. R. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS/EDUFSC, 2010.

Thrower, S. & Lim, L. The nuclear oestrogen receptor in the female rat. Effects of oestradiol administration during the oestrous cycle on the uterus and contrasting effects of progesterone on the uterus and hypothalamus. *Biochem. J.*, 198(2):385-89, 1981.

Vigo, C. L. S.; Narita, E. & Marques, L. C. Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng). Pedersen – Amaranthaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* 13(2): 46-49, 2003.

Yang, S. H. U.; Mei, C. A. O.; Zhong-Qiong, Y. I. N.; Ping, L. I.; Tai-Qiang, L. I.; Xing-Fa, L. O. N. G.; Lian-Fa, Z. H. U.; Ren-Yong, J. I. A.; Shu-Jun, D. A. I. & Jian, Z. H. A. O. The reproductive toxicity of saponins isolated from Cortex Albiziae in female mice. *Chin. J. Nat. Med.*, 13(2):119-26, 2015.

Yu, W. J. Modulating effects of *Korean ginseng* saponins on ovarian function in immature rats. *Biol. Pharm. Bull.*, 26(11):1574-80, 2003.

## **Anexo I**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
Faculdade de Ciências e Letras de Assis  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

### CERTIFICADO

CERTIFICAMOS que o Projeto "*Avaliação dos efeitos do extrato de sisal (Agave sisalana) sobre os aspectos morfológicos dos ovários e útero, fertilidade e produtos da gestação de ratas albinas*", Registro nº 005/2013, sob responsabilidade do(a) Pesquisador(a) **Isabel Cristina Cherici Camargo** e execução do(a) aluno(a) **Amanda Martins Viel**, conforme registrado, atende à legislação vigente no que tange ao respeito aos princípios éticos na experimentação animal:

Animais utilizados: **rato heterogênico Wistar**

Número de animais solicitados e autorizados: **66 (sessenta e seis)**

CERTIFICAMOS, ainda, que o referido projeto será desenvolvido em 15 meses, no período de novembro/2014 a fevereiro/2016, sendo que o Relatório parcial deverá ser entregue em maio/2015 e o relatório final em março/2016.

Assis, 12 de novembro de 2014.

**Edislane Barreiros de Souza**  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

## Anexo II



ISSN 0717-9502 versão online  
ISSN 0717-9367 versão impresa

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação do manuscritos](#)
- [Envío de manuscritos](#)

### Escopo e política

#### DO CONTEÚDO

**International Journal of Morphology (Revista Internacional de Morfología)**, Impressa ISSN 0717-9367, Eletrônica ISSN 0717-9502, é o Órgão Oficial das Sociedades Chilena, Argentina e Panamericana de Anatomia. É a continuação da *Revista Chilena de Anatomia* (Chilean Anatomical Journal) com publicação de periodicidade trimestral. Tem por finalidade publicar artigos originais relacionados com todas as áreas da Morfologia, Anatomia, Histologia, Embriologia e Biologia do Desenvolvimento, bem como com outros campos das Ciências Morfológicas, incluindo Biologia Celular e Molecular. Também aceita Temas de Revisão e Atualização, Comunicações Breves e Cartas ao Editor.

Submissão eletrônica dos artigos: os manuscritos devem ser enviados por email (Texto e Tabelas em formato Word e Figuras em formato jpg a 300 dpi).

São aceitos artigos inéditos, escritos em espanhol ou inglês.

Na Carta ao Editor, assinada por todos os autores, deverá constar expressamente que o manuscrito foi lido e aprovado por todos os autores, que se cumpriu com os requisitos de autoria e que não foi publicado ou enviado simultaneamente à outra revista.

**Correspondência: Dr. Mariano del Sol, Editor International Journal of Morphology, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile.**

**Fax: (56-45) 232-5600**

**Email: [ijmorpho@ufrontera.cl](mailto:ijmorpho@ufrontera.cl); [mariano.delsol@ufrontera.cl](mailto:mariano.delsol@ufrontera.cl)**

Os trabalhos serão submetidos à apreciação do Conselho Editorial e do Conselho Científico. A revisão será realizada por dois assessores, membros do Conselho Editorial e/ou Conselho Científico, e assessores «ad hoc» especialistas na área do trabalho. Os especialistas no tema definirão se o trabalho será: a) publicado; b) publicado com modificações ou c) recusado.

Cópia dos pareceres serão enviadas ao autor principal.

## Forma preparação do manuscrito

### DO FORMA

Os trabalhos não devem exceder 12 páginas (incluindo texto e Referências Bibliográficas). Cada trabalho deverá apresentar:

- **Folha de rosto:** título, subtítulo se necessário, com versão em inglês (se for escrito em inglês, com tradução para o castelhano); nome(s) do(s) autor(es), com respectiva afiliação institucional; se foi subvencionado, indicar o patrocínio e o número do processo no rodapé da página.
- **Resumo** (estruturado) em espanhol, não excedendo 300 palavras. Palavras chave.
- **Texto:** Introdução, Material e Método, Resultados e Discussão.
- **Tabelas e ilustrações:** Tabelas deverão ser enumeradas com algarismos romanos e ilustrações com algarismos arábicos, em folhas separadas do texto. As tabelas necessitam de títulos e as ilustrações de legendas, em folhas separadas. Para a reprodução das ilustrações, serão aceitos desenhos somente de boa qualidade. Caso seja necessário, podem ser usadas letras, números ou símbolos transferíveis.
- **Resumo em inglês** - palavras chave em inglês.
- **Agradecimentos.**
- **Referências Bibliográficas.** Máximo de 25 Referências. Devem ser colocadas em ordem alfabética, pelo sobrenome dos autores, obedecendo as Normas Técnicas da Revista. Todos os autores devem constar nas Referências Bibliográficas. No texto, caso haja mais de dois autores coloca-se «*et al.*» depois do nome do primeiro, acompanhado do ano de publicação entre parênteses, somente na primeira citação. Os nomes dos autores deverão estar em letras minúsculas tanto no Texto como nas Referências Bibliográficas. O ano deverá ser repetido em cada citação quando o autor tiver mais de um trabalho mencionado.

### Exemplos:

Castrogiovanni, P.; Mazzone, V. & Imbesi, R. Immunolocalization of HB-EGF in human skin by streptavidin-peroxidase (HRP) conjugate method. *Int. J. Morphol.*, 29(4):1162-7, 2011.

Moore K.L.; Dalley A. F. & Agur, A. M. R. *Clinically Oriented*

*Anatomy*. 6th ed. Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

**NOMENCLATURA.** A nomenclatura usada conforme a última edição da *Terminologia Anatômica*, *Terminologia Histológica*, *Terminologia Embriológica*, *Nômina Anatômica Veterinária* ou *Nômina Anatômica Avium*. Os termos em latim podem ser traduzidos para o idioma vernáculo (espanhol ou inglês).

**CUSTOS DE PUBLICAÇÃO.** O custo de publicação é de US \$ 250 dólares (artigos em branco e preto) e de US \$ 300 por cada página em cores. Os artigos, incluindo a tradução do resumo para o espanhol, poderão ser revisados com um custo de US \$ 50.