

**Análise do consumo de chá das folhas de amoreira-negra sobre a morfologia e  
biomecânica óssea em ratas ovariectomizadas**

**Analysis of tea consumption of blackberry leaves on bone morphology and biomechanics  
of ovariectomized rats**

**Análisis del consumo de té de hojas de blackberry en morfología óssea y biomecánica en  
ratas ovariectomizadas**

Recebido: 09/07/2020 | Revisado: 16/07/2020 | Aceito: 17/07/2020 | Publicado: 01/08/2020

**Pedro Alberto Ferreira Cavichioli**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5219-7253>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [pedroafcavichioli@gmail.com](mailto:pedroafcavichioli@gmail.com)

**Thiago Donizeth da Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5039-6651>

Universidade José do Rosário Vellano, Brasil

E-mail: [odontothiagosilva@gmail.com](mailto:odontothiagosilva@gmail.com)

**André Luiz Thomaz de Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5158-9247>

Centro Universitário do Vale do Ribeira, Brasil

E-mail: [alfenas2@hotmail.com](mailto:alfenas2@hotmail.com)

**Flávia da Ré Guerra**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9142-9109>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [flavia.guerra@unifal-mg.edu.br](mailto:flavia.guerra@unifal-mg.edu.br)

**Alessandra Esteves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6457-7050>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [aesteves@unifal-mg.edu.br](mailto:aesteves@unifal-mg.edu.br)

**Wagner Costa Rossi Junior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1901-9978>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [wagner.rossi@unifal-mg.edu.br](mailto:wagner.rossi@unifal-mg.edu.br)

**José Antônio Dias Garcia**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4024-3045>

Universidade José do Rosário Vellano, Brasil

E-mail: [jadiasgarcia@gmail.com](mailto:jadiasgarcia@gmail.com)

**Evelise Aline Soares**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7838-687X>

Universidade Federal de Alfenas, Brasil

E-mail: [evelise.anatomia@gmail.com](mailto:evelise.anatomia@gmail.com)

## **Resumo**

O objetivo principal do estudo foi avaliar os efeitos do chá das folhas de amoreira-negra nos parâmetros morfológicos e biomecânicos ósseos em ratas ovariectomizadas. Para tal foi realizado um estudo experimental conduzido com ratas da linhagem wistar, divididas em quatro grupos experimentais, com ou sem ovários (n=32), aos quais foram oferecidos água filtrada *ad libitum* ou chá (forma de infusão) das folhas de *Morus Nigra* L. Após 60 dias de experimentação, os fêmures direitos foram retirados e submetidos a análise das propriedades morfológicas e biomecânicas. Como metodologia, durante o experimento os animais ganharam peso através da dieta baseada em consumo de componente sólido (ração) e de líquidos (chá ou água), dentro dos escassos padrões para roedores. O consumo de chá de folhas de amor revelou efeitos nas propriedades morfológicas ósseas e diminuição da resistência óssea em ratas ooforectomizados. A oferta do chá de folhas de *Morus Nigra* L. teve efeitos positivos nas propriedades morfológicas e biomecânicas dos fêmures, sugerindo maior resistência óssea no grupo de ratas não ovariectomizadas.

**Palavras-chave:** Osso; Morus; Medicina; Ortopedia.

## **Abstract**

The main objective of the study was to evaluate the effects of blackberry leaf tea on bone morphological and biomechanical parameters in ovariectomized rats. For this purpose, an experimental study was conducted with rats of the Wistar lineage, divided into four experimental groups, with or without ovaries (n=32), who were offered filtered water *ad libitum* or tea (form of infusion) of the leaves of *Morus Nigra* L. After 60 days of experimentation, the right femurs were removed and subjected to analysis of morphological and biomechanical properties. As a methodology, during the experiment the animals gained weight through a diet based on consumption of solid components (feed) and liquids (tea or

water), within the few standards for rodents. The consumption of blackberry leaf tea revealed effects on bone morphological properties and decreased bone resistance in oophorectomized rats. The offer of *Morus Nigra* L. leaf tea had positive effects on the morphological and biomechanical properties of the femurs, suggesting greater bone resistance in the group of non-ovariectomized rats.

**Keywords:** Bone; Morus; Medicine; Orthopedics.

## Resumen

El objetivo principal del estudio fue evaluar los efectos del té de hojas de mora en los parámetros morfológicos y biomecánicos del hueso en ratas ovariectomizadas. Para este propósito, se realizó un estudio experimental con ratas del linaje Wistar, divididas en cuatro grupos experimentales, con o sin ovarios (n=32), a quienes se les ofreció agua filtrada *ad libitum* o té (forma de infusión) de las hojas de *Morus Nigra* L. Después de 60 días de experimentación, se retiraron los fémures correctos y se los sometió a análisis de propiedades morfológicas y biomecánicas. Como metodología, durante el experimento los animales aumentaron de peso a través de una dieta basada en el consumo de componentes sólidos (alimento) y líquidos (té o agua), dentro de los pocos estándares para roedores. El consumo de té de hojas de mora reveló efectos sobre las propiedades morfológicas de los huesos y una disminución de la resistencia ósea en ratas ooforectomizadas. La oferta de té de hoja *Morus Nigra* L. tuvo efectos positivos sobre las propiedades morfológicas y biomecánicas de los fémures, lo que sugiere una mayor resistencia ósea en el grupo de ratas no ovariectomizadas.

**Palabras clave:** Hueso; Morus; Medicamento; Ortopedia.

## 1. Introdução

O uso das plantas medicinais configura-se como uma prática milenar direcionada ao tratamento alternativo de enfermidades. Essa utilização apresenta um grande número de adeptos nos países subdesenvolvidos, onde o acesso ao sistema de saúde é limitado (Volpato, et al., 1997). Quase sempre fundamentada apenas pela sabedoria popular, por meio do conhecimento empírico que integra o binômio cultura/saúde, é fundamental que sua eficácia seja comprovada por meio de estudos experimentais e clínicos (Alvim, et al., 2006).

A *Morus Nigra* L. (*MnL.*), popularmente conhecida como amoreira negra, é uma espécie vegetal de origem asiática, amplamente cultivada nas regiões sul e sudeste do Brasil. Estima-se que existam em torno de 100 variedades conhecidas da sua espécie, cujo

reconhecimento pela população brasileira se deve às propriedades terapêuticas a ela atribuída (Oliveira, et al., 2013).

Nas últimas décadas, experimentos em *in vivo* com a *MnL*. revelaram efeitos significativos no controle glicêmico no diabetes *mellitus*, na atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória e na redução de anormalidades esqueléticas fetais em ratas diabéticas (Song, et al., 2009). Associado a isso, a hipótese sobre o seu potencial efeito estrogênico tem chamado a atenção no meio científico (Volpato, et al., 1997).

Em algumas regiões do Brasil, o consumo do chá das folhas da *MnL*. é utilizado pelas mulheres como meio alternativo para a reposição hormonal de estrógeno no climatério. No entanto, a literatura apresenta controvérsias sobre esses efeitos, revelando que esse consumo não resulta em diferenças significativas na reposição de estrógeno em ratas ooforectomizadas (Silva, et al., 2007).

Dentre as muitas complicações associadas ao climatério, os efeitos sobre o metabolismo ósseo diante do declínio na concentração de estrógeno é um importante agravoclinico, que resulta na diminuição da densidade mineral óssea e, conseqüentemente, no aumento dos riscos para as fraturas óssea. Nesse contexto, as terapias de reposição hormonal representam a principal forma de tratamento no meio médico (Cauley, et al., 2015).

Estudos surgidos a partir dos anos 2000 relacionados à terapia hormonal apontaram a discreta eficácia ou até ineficácia dos hormônios, bem como advertiram para efeitos adversos graves, como câncer de mama, câncer de endométrio (só estrogoterapia), câncer de ovário, risco de doença coronariana, acidente vascular encefálico, trombose venosa profunda, demência e doença de Alzheimer (Oppermann-Lisbôa & Wannmacher, 2001).

É fundamental, portanto, que o profissional da área médica amplie seu envolvimento com as ciências básicas por meio de pesquisas *in vitro* e *in vivo* sobre os efeitos de diferentes tratamentos em saúde, em especial o uso de fitoterápicos, que podem se apresentar como meio alternativo ao tratamento e controle dos sintomas de várias patologias.

Diante das controvérsias relacionadas à atividade estrogênica atribuída à *MnL*. e conseqüentemente ao risco aumentado de fraturas ósseas durante o climatério, o presente estudo teve por objetivo pesquisar a interação entre o consumo do chá das folhas da *MnL*. e as propriedades biomecânicas e morfológicas de fêmures de ratas ovariectomizadas.

## **2. Metodologia**

### **2.1 Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado sob parecer de nº 31A/2014 e todas as etapas foram conduzidos de acordo com Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS). A pesquisa foi desenvolvida por meio de parceria entre a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) e UNIFENAS.

### **2.2 Animais**

O estudo foi conduzido com 32 ratas fêmeas adultas (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, selecionadas por conveniência amostral, com 40 dias de vida, massa corpórea em média de  $185 \pm 2,5$ g, mantidos no Laboratório de Experimentação Animal da UNIFENAS em estantes ventiladas (Alesco, Monte Mor, SP, Brasil), com temperatura controlada de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h, sendo permitido o acesso livre a água e a dieta sólida comercial balanceada (Nuvilab CR-1; Nuvital, Colombo-PR, Brasil).

Inicialmente, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos ( $n=4$ ) e alocados em caixas plásticas conjuntas, oito animais por caixa, permanecendo o modo de movimento até a eutanásia. Em todos os grupos, a dieta líquida foi oferecida em frascos de 500 mL para consumo livre. A cada 48 horas, as dietas sólida e líquida foram alteradas e os valores residuais foram registrados; além disso, os animais foram pesados semanalmente.

### **2.3 Protocolo experimental**

As ratas foram divididas em quatro grupos experimentais ( $n=8$ ), conforme a Tabela 1 em seguida.

**Tabela 1.** Composição dos grupos envolvidos no estudo (Alfenas-MG, Brasil, 2014).

		Ovários	
		Presente	Ausente
Consumo do chá da folha da <i>MnL.</i>	Ausente	G1	G3
	Presente	G2	G4

G1: fêmeas não ovariectomizadas, tratadas com água filtrada *ad libitum*;

G2: fêmeas não ovariectomizadas, tratadas com chá das folhas da *MnL.*;

G3: fêmeas ovariectomizadas, tratadas com água filtrada *ad libitum*;

G4: fêmeas ovariectomizadas, tratadas com chá das folhas da *MnL.*

Fonte: Autores.

## 2.4 Procedimento cirúrgico

Dois grupos (G3 e G4) foram selecionados aleatoriamente para a realização da laparotomia bilateral para remoção dos ovários (ovariectomia), que ocorreu logo na primeira semana, antes do início dos tratamentos nos grupos experimentais. Após anestesia por via intraperitoneal (IP), com Xilazina/Ketamina na concentração de 0,10 mL/100 g, foi realizada uma incisão de 1,5 cm lâmina com de bisturi n°15 bilateralmente na parede abdominal, sobre a região pré-pubiana. Na sequência, os ovários foram identificados e removidos e a região incisada recebeu sutura em blocos com pontos simples com fio de seda 4-0.

Ao término da cirurgia, os animais receberam analgesia com dipirona sódica 500 mg/mL adicionado à água filtrada, na dosagem 875 mg/kg, por gavagem, e profilaxia antibiótica com benzilpenicilina (120,000 UI) e estreptomicina (50 mg), administrado por via intramuscular, ambos realizados em dose única. Os animais foram mantidos em recuperação por um período de 48 horas.

## 2.5 Preparo do chá das folhas de *MnL.*

As folhas da planta acima mencionada foram coletadas em Alfenas, Minas Gerais, Brasil, por um botânico experiente no uso de plantas medicinais em um horto onde a amoreira se desenvolveu sem uso de agrotóxico (naturalmente). Após a coleta as folhas eram colocadas no sol para secagem e trituração manual. O preparo do chá foi realizado sempre anteriormente as trocas de mamadeiras e dosagens estimadas do consumo líquido, a partir da infusão de 50g de folhas da *MnL.* em 500 mL de água filtrada a 100°C.

## 2.6 Tratamento e eutanásia

O tratamento com o chá da folha da *MnL*. foi oferecido por um período de 60 dias aos animais do grupo G2 e G4, e ao término, todos os animais foram eutanasiados por meio de overdose anestésica com Xilazina/Ketamina por via IP na concentração de 6-40 mg/kg. Na sequência os fêmures direitos foram removidos, limpos (remoção de tecidos moles), medidos (medidas das dimensões), acondicionados em gaze embebida em solução fisiológica (0.9%) e armazenados em freezer (-20°C) até o dia anterior ao ensaio mecânico (Garcia, et al., 2015). Os fêmures esquerdos foram separados para processamento histológico.

## 2.7 Análise morfométrica do fêmur

Com o auxílio de um paquímetro digital (Starrett®), foram feitas as medidas das dimensões dos fêmures. Cada medida corresponde à distância entre dois pontos de referência do próprio osso (Lammers, et al., 1998). Para tanto, coletou-se: (A) *comprimento do fêmur (mm)*: do ponto mais proximal na cabeça do fêmur até o ponto mais distal na outra extremidade do osso; (B) *largura da diáfise do fêmur (mm)*: largura por meio da porção mais estreita na metade do fêmur; (C) *largura do fêmur proximal (mm)*: do ponto mais anterior na cabeça do fêmur até a ponta do trocânter maior; (D) *largura do fêmur distal (mm)*: largura por meio dos côndilos (sentido anteroposterior), perpendicular ao comprimento do fêmur.

### 2.7.1 Área trabecular e do osso cortical

Para esta análise, foram utilizados fêmures, sendo que, para cada osso, foram utilizados seis cortes histológicos e, de cada corte, foram capturados dois campos. Assim, foi utilizado um total de 72 campos, que foram escolhidos aleatoriamente. O número mínimo e confiável de campos para as medidas morfométricas foi obtido (Mandarim-de-Lacerda, 1995). Em nosso estudo, a epífise proximal e a haste tibial esquerda foram utilizadas.

As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% por 72 horas à temperatura ambiente e descalcificadas em solução de ácido fórmico, formol e citrato de sódio durante 35 dias. Em seguida, as amostras foram processadas através de técnicas histológicas de rotina e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes transversais com 5µm de espessura, que foram corados com Hematoxilina-Eosina.

Na sequência, foi realizada a medida da área e da espessura das trabéculas ósseas na epífise proximal das tíbias e a mensuração da área e espessura cortical da diáfise das tíbias, com auxílio do software NIS-Elements: Advanced Research (USA) com objetiva de 20X acoplado a um fotomicroscópio da marca Nikon modelo Eclipse E400 com câmera Nikon modelo DXM 1200C.

### **2.7.2 Ensaio mecânicos**

Os fêmures direitos foram submetidos a teste mecânico de resistência no Departamento de Anatomia da UNIFAL-MG em um módulo de flexão de três pontos, TA.XT plus (texture analyser), utilizando uma célula de carga de 50 Kgf, a uma velocidade de 1.3 mm/min. A distância entre as duas extremidades ósseas foi de 50 mm, e, para se obter o valor da resistência, uma carga foi aplicada no terço médio do osso (Garcia, et al., 2015).

Os fêmures foram testados no plano anteroposterior (concavidade voltada para cima), com o lado anterior voltado para cima, suportando compressão, e com o lado posterior para baixo suportando tensão. Os resultados dos testes foram registrados em um computador acoplado ao equipamento, obtendo a máxima força e curva de deslocamento. Por fim, foram realizadas análises das propriedades mecânicas e estruturais dos fêmures.

### **2.8 Análise dos dados**

Para avaliar o efeito da interação dos tratamentos nos grupos experimentais, foi empregada a análise de variância em esquema fatorial dos tratamentos, sendo dois fatores: (a) presença e ausência dos ovários; (b) presença e ausência do chá das folhas da *MnL*. A comparação entre os grupos experimentais foi realizada pelo teste de Tukey e os resultados foram dispostos em média  $\pm$  erro padrão, com significância de 5%.

## **3. Resultados**

O ganho de peso (g), a ingestão de sólidos (g) e a ingestão de líquidos (mL) foram satisfatórios, sem interações significativas nos grupos experimentais. No entanto, a ausência de ovários nos grupos experimentais resultou em uma ingestão de líquidos (mL) significativamente maior quando comparada aos grupos com os ovários presentes.



**Tabela 2.** Comparação das médias entre os grupos experimentais para o ganho de peso (g), a ingestão sólida (g) e a ingestão líquida (mL) (mensurado a cada 48h), oito animais por grupo.

Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão (Alfenas-MG, Brasil, 2014).

Variáveis	Ovários <sup>1</sup>		Chá da <i>MnL</i> . <sup>1</sup>	
	Presentes	Ausentes	Ausente	Presente
Ganho de peso (g)	299,12 $\pm$ 8,50 <sup>a</sup>	313,37 $\pm$ 8,50 <sup>a</sup>	310,43 $\pm$ 8,50 <sup>a</sup>	302,06 $\pm$ 8,50 <sup>a</sup>
Ingestão sólida (g)	88,62 $\pm$ 1,99 <sup>a</sup>	89,93 $\pm$ 1,99 <sup>a</sup>	89,18 $\pm$ 1,99 <sup>a</sup>	89,37 $\pm$ 1,99 <sup>a</sup>
Ingestão líquida (mL)	60,12 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>	64,25 $\pm$ 1,32 <sup>b</sup>	62,56 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>	61,81 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>

Nota: Chá da *MnL*. <sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Fonte: Autores.

É notável que a ausência de ovários nos grupos experimentais resultou em uma ingestão de líquidos (mL) significativamente maior quando comparada aos grupos com os ovários presentes, conforme ilustrado na Tabela 2.

As análises das propriedades morfométricas não revelaram diferenças significativas e interações nos grupos experimentais para as variáveis de comprimento do fêmur (mm), de largura proximal do fêmur (mm) e de largura da diáfise do fêmur (mm).

**Tabela 3.** Comparação das médias entre os grupos experimentais para propriedades morfométricas do fêmur direito, oito animais por grupo. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão (Alfenas-MG, Brasil, 2014).

Variáveis	Ovários <sup>1</sup>		Chá da <i>MnL</i> . <sup>1</sup>	
	Presentes	Ausentes	Presentes	Ausentes
Comprimento do fêmur (mm)	24,43 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	24,31 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	24,37 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>	24,37 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup>
Largura proximal do fêmur (mm)	9,81 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	9,56 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	10,00 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	9,37 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>
Largura da diáfise do fêmur (mm)	7,21 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	6,71 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	6,75 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	7,18 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>

Nota: Chá da *MnL*. <sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Fonte: Autores.

Conforme ilustrado na Tabela 3, podemos observar que as variáveis em questão (comprimento, largura proximal e da diáfise dos fêmures) não revelaram diferenças muito significativas quando comparados os grupos dos animais estudados.

Ao analisar as demais variáveis relacionadas às propriedades morfométricas, foram observadas interações significativas entre o consumo de chá das folhas de *MnL.* e a ausência dos ovários, cujos valores médios foram inferiores em relação ao consumo de água filtrada e a presença dos ovários. Além disso, destaca-se que na maioria das variáveis investigadas os grupos foram diferentes entre si. Estes resultados sugerem que o consumo de chá das folhas da *MnL.* está associado com a diminuição nas propriedades morfométricas em animais ovariectomizadas.

**Tabela 4.** Comparações entre os grupos experimentais para as propriedades morfométricas do fêmur direito, oito animais por grupo. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão (Alfenas-MG, Brasil, 2014).

Variáveis				Ovários <sup>1</sup>	
				Presentes	Ausentes
Largura distal do fêmur (mm)	<b>Chá da</b>	Ausente		6,31 $\pm$ 0,20 <sup>aA</sup>	6,93 $\pm$ 0,20 <sup>bA</sup>
	<b>MnL.<sup>1</sup></b>	Presente		8,06 $\pm$ 0,20 <sup>aB</sup>	7,31 $\pm$ 0,20 <sup>bA</sup>
Área trabecular ( $\mu\text{m}^2$ )	<b>Chá da</b>	Ausente		15,25 $\pm$ 0,43 <sup>aA</sup>	19,06 $\pm$ 0,43 <sup>bA</sup>
	<b>MnL.<sup>1</sup></b>	Presente		20,12 $\pm$ 0,43 <sup>aB</sup>	16,87 $\pm$ 0,43 <sup>bB</sup>
Espessura trabecular ( $\mu\text{m}$ )	<b>Chá da</b>	Ausente		1,83 $\pm$ 0,10 <sup>aA</sup>	2,52 $\pm$ 0,10 <sup>bA</sup>
	<b>MnL.<sup>1</sup></b>	Presente		2,86 $\pm$ 0,10 <sup>aB</sup>	2,72 $\pm$ 0,10 <sup>aA</sup>
Área cortical ( $\mu\text{m}^2$ )	<b>Chá da</b>	Ausente		18,50 $\pm$ 0,54 <sup>aA</sup>	25,50 $\pm$ 0,54 <sup>bA</sup>
	<b>MnL.<sup>1</sup></b>	Presente		26,50 $\pm$ 0,54 <sup>aB</sup>	24,87 $\pm$ 0,54 <sup>bA</sup>
Espessura cortical ( $\mu\text{m}$ )	<b>Chá da</b>	Ausente		2,95 $\pm$ 0,09 <sup>aA</sup>	3,73 $\pm$ 0,09 <sup>bA</sup>
	<b>MnL.<sup>1</sup></b>	Presente		3,96 $\pm$ 0,09 <sup>aB</sup>	3,70 $\pm$ 0,09 <sup>aA</sup>

Nota: Chá da *MnL.* <sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha ou mesma letra maiúscula na coluna são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Fonte: Autores.

Nos resultados expressos nas Tabela 4, as linhas indicam as comparações entre a presença e ausência dos ovários e as colunas indicam as comparações entre a presença e ausência do consumo do chá das folhas da *MnL.* Os resultados das propriedades biomecânicas (estruturais e materiais) evidenciaram interações significativas entre o consumo de chá das folhas de *MnL.* e a ovariectomia.

**Tabela 5.** Comparações entre grupos experimentais para as propriedades materiais e estruturais do fêmur direito, oito animais por grupo. Resultados expressos em média  $\pm$  erro padrão (Alfenas-MG, Brasil, 2014).

Variáveis			Ovários <sup>1</sup>	
			Presentes	Ausentes
Força Máxima (N)	Chá da <i>MnL</i> . <sup>1</sup>	Ausente	140,16 $\pm$ 5,86 <sup>aA</sup>	192,46 $\pm$ 5,86 <sup>bA</sup>
		Presente	201,00 $\pm$ 5,86 <sup>aB</sup>	193,27 $\pm$ 5,86 <sup>aA</sup>
Deslocamento (mm)	Chá da <i>MnL</i> . <sup>1</sup>	Ausente	0,35 $\pm$ 0,04 <sup>aA</sup>	0,68 $\pm$ 0,04 <sup>bA</sup>
		Presente	0,75 $\pm$ 0,04 <sup>aB</sup>	0,51 $\pm$ 0,04 <sup>bB</sup>
Rigidez extrínseca (N/mm)	Chá da <i>MnL</i> . <sup>1</sup>	Ausente	71,42 $\pm$ 4,35 <sup>aA</sup>	120,32 $\pm$ 4,35 <sup>bA</sup>
		Presente	142,57 $\pm$ 4,35 <sup>aB</sup>	120,10 $\pm$ 4,35 <sup>bA</sup>
Tensão máxima (MPa)	Chá da <i>MnL</i> . <sup>1</sup>	Ausente	15,13 $\pm$ 0,71 <sup>aA</sup>	28,43 $\pm$ 0,71 <sup>bA</sup>
		Presente	30,02 $\pm$ 0,71 <sup>aB</sup>	28,93 $\pm$ 0,71 <sup>aA</sup>
Módulo de elasticidade (MPa)	Chá da <i>MnL</i> . <sup>1</sup>	Ausente	61,18 $\pm$ 1,94 <sup>aA</sup>	88,52 $\pm$ 1,94 <sup>bA</sup>
		Presente	89,85 $\pm$ 1,94 <sup>aB</sup>	84,68 $\pm$ 1,94 <sup>aA</sup>
Deformação (MPa)	Chá da <i>MnL</i> . <sup>1</sup>	Ausente	0,35 $\pm$ 0,01 <sup>aA</sup>	0,13 $\pm$ 0,01 <sup>bA</sup>
		Presente	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>aB</sup>	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>aA</sup>

Nota: Chá da *MnL*.<sup>1</sup>Médias seguidas de mesma letra minúscula na linha ou mesma letra maiúscula na coluna são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ( $P \leq 0,05$ ). Fonte: Autores.

Nos resultados expressos nas Tabela 5, as linhas indicam as comparações entre a presença e ausência dos ovários e as colunas indicam as comparações entre a presença e ausência do consumo do chá das folhas da *MnL*. Foi revelada uma diminuição na resistência óssea frente ao consumo do chá, observada por meio da diminuição na força máxima (N) necessária para romper o osso, do deslocamento (mm), da rigidez extrínseca (N/mm), da tensão máxima (MPa), do módulo de elasticidade (MPa) e por fim destaca-se o aumento na deformação (MPa) do osso. Além disso, os grupos experimentais também apresentaram, em sua grande maioria, diferenças estaticamente significativas entre si.

#### 4. Discussão

Os ratos wistar favorecem os estudos de diversas doenças humanas e seus tratamentos, superando as limitações dos estudos clínicos, permitindo a análise da biomecânica óssea a partir de ensaios dos ossos após eutanásia (Bueno, et al., 2011). Grande parte dos estudos que envolvem as propriedades materiais e estruturais dos ossos são provenientes de estudos experimentais, o que tem ajudado a compreender a resistência e fragilidade óssea mediante ao uso de diversas substâncias (Horvath, et al., 2011; Garcia, et al., 2015).

Como este é um modelo convencional para pesquisa em biomecânica óssea, o presente estudo optou por usar a espécie de ratas Novergicus Wistar. A partir do uso crônico de *MnL*., o ganho de peso durante o experimento e as condições de saúde animal foram monitorados, descartando desidratação ou desnutrição.

A baixa ingesta líquida e sólida por roedores em condições experimentais pode provocar modificações nas respostas biológicas em experimentação animal. Para tal, os pesquisadores acompanharam durante o experimento o consumo líquido, sólido (ração) e o ganho de peso das ratas (Weisbroth, et al., 1977). De acordo com Palencia, et al., (1994), a ingesta sólida inferior a 25 g/dia e as perdas de peso acentuadas ao longo do experimento caracterizam a desnutrição em ratos.

Portanto, nossos resultados demonstraram que as ratas consumiram quantidade de ração acima dos valores sugeridos pelo autor e que não houve diferença significativa entre os grupos do estudo, descartando a possibilidade de desnutrição. O consumo de líquido deve variar entre 15 e 80mL ao dia para manter a hidratação de ratos (Hau & Shapiro, 1984).

Todas as ratas no presente estudo mantiveram o consumo líquido dentro dos limites, limites ideais para restringir a possibilidade de desidratação. Os resultados demonstram que todas as ratas ganharam peso durante o experimento, dessa forma os achados biomecânicos apresentados neste estudo estão diretamente relacionados as ações do consumo do chá das folhas da *MnL*.

Haja vista que o consumo do chá acima mencionado é comum pelas mulheres no climatério em algumas regiões do Brasil, principalmente no sul e sudeste, é fundamental que estudos experimentais e clínicos comprovem sua eficácia, já que a literatura é escassa e controversa. Oliveira, et al., (2013), realizaram um ensaio toxicológico pré-clínico para analisar a toxicidade do chá das folhas de *MnL*. durante 30 dias por via oral em ratos, comparando os resultados com grupo controle que recebeu apenas água.

Durante o experimento, estes autores avaliaram a presença de sinais de toxicidade, variação do peso corporal, o consumo de líquido e sólido. Não foram observados sinais de toxicidade e também não houve alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos (Oliveira, et al., 2013). Outros estudos comprovam o baixo potencial de toxicidade no uso das folhas de *MnL* em concentrações de até 0,7 mg/mL (Santos, et al., 2020). No presente trabalho, optamos pelo uso do chá com infusão, simulando o uso popular por mulheres nas regiões acima mencionadas, onde é comum encontrar amoreiras.

A ovariectomia experimental é um modelo de estudo que permite avaliar, em animais, as consequências da perda de massa óssea em diversas situações (Haddad; Salazare & Hernandez, 2015). O processo foi realizado com objetivo de simular uma condição semelhante a menopausa em mulheres, mas em ratas. Esse período é extremamente relevante nesse grupo populacional, uma vez que as alterações no metabolismo ósseo são mais comuns e significativas, incluindo riscos elevados de fratura e perda da qualidade de vida (Tanaka, et al., 1998).

A diminuição dos níveis de estrógeno altera o processo de remodelação e a reparação óssea (Amadei, et al., 2006). Este estudo revelou que o consumo do chá das folhas de *MnL* resulta na diminuição das propriedades morfológicas e biomecânicas dos fêmures em ratas ovariectomizadas, o que reflete no aumento dos riscos para as fraturas ósseas. Por outro lado, em ratas com ovários presentes (não ovariectomizadas), o risco foi reduzido em relação ao não consumo do chá, sugerindo maior resistência do fêmur e menor propensão a fraturas.

De acordo com Silva, et al., (2007), a infusão das folhas da *MnL* tem efeito semelhante ao obtido com o uso de estrogênio, sendo usado como substituto da terapêutica da reposição hormonal por mulheres no climatério e também indicado no alívio da tensão pré-menstrual. Os potenciais efeitos atribuídos a essa substância como repositora hormonal de estrógeno resultam da hipótese sobre a presença de isoflavonas em suas folhas, também denominadas como fito estrógeno.

As isoflavonas são compostos orgânicos naturais de origem vegetal pouco distribuídos na natureza, com efeito estrogênico por apresentarem semelhança estrutural ao hormônio em questão (Simões, et al., 2007). Como o grupo de ratas não ovariectomizadas consumidoras do chá da folha de *MnL* exibiram achados biomecânicos compatíveis com a melhora da resistência óssea, podemos propor que, neste grupo o consumo do chá tenha atuado como um protetor ósseo.

Os mecanismos envolvidos nesse processo não foram totalmente elucidados nesse estudo, mas acreditamos que haja uma interação positiva entre o chá da *MnL* e o estrogênio

presente nas ratas não ovariectomizadas. As principais limitações encontradas foram a não aferição dos níveis séricos de estrogênio nos animais envolvidos no estudo, assim como a ausência de análise fitoquímica do chá de *MnL.*, sendo essas as sugestões para abordagens futuras.

## 5. Conclusão

Conclui-se que o consumo do chá da folha da *MnL.* apresentou efeitos positivos, no que se refere a propriedades morfológicas e biomecânicas dos fêmures, sugerindo maior resistência óssea apenas no grupo de ratas não ovariectomizadas.

Destacamos que a literatura carece de investigação científica sobre o potencial fitoestrogênico das folhas da *MnL.* no climatério e que até o momento desconhecem-se estudos que tenham investigado os efeitos do consumo dessa substância na morfologia e biomecânica óssea no contexto da prática clínica na medicina.

## Referências

Alvim, N. A. T., Ferreira, M. A., Cabral, I. E., & Filho, A. J. A. (2006). O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional as implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 14 (3), 316-326. Recuperado de [https://www.scielo.br/pdf/rlae/v14n3/pt\\_v14n3a03.pdf](https://www.scielo.br/pdf/rlae/v14n3/pt_v14n3a03.pdf)

Amadei, S. U., Silveira, V. A. S., & Pereira, A. C. (2006). A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 42 (1), 5-12. Recuperado de <https://www.scielo.br/pdf/jbpm/v42n1/29910.pdf>

Bueno, A. C., Ribeiro, K. G., Cruz, T. M., Ivo, T. P. F., Nakagaki, W. R., Faria, A. R. A. B., Camilli, J. K., Garcia, J. A. D., Chavasco, J. K., & Soares, E. A. (2011). Efeitos da fumaça de cigarro sobre a osteogênese e a resistência mecânica óssea em ratos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 32 (1), 211-215. Recuperado de [https://pdfs.semanticscholar.org/6134/10415356fccb348a0149aee1d069b2296bae.pdf?\\_ga=2.91419033.2019253660.1594932119-767760540.1594932119](https://pdfs.semanticscholar.org/6134/10415356fccb348a0149aee1d069b2296bae.pdf?_ga=2.91419033.2019253660.1594932119-767760540.1594932119)

Cauley, J. A. (2015). Estrogen and bone health in men and women. *Steroids*, 99 (Pt A), 11-15. doi: 10.1016/j.steroids.2014.12.010

Garcia, J. A. D., Souza, A. L. T., Cruz, L. H. C., Marques, P. P., Camilli, J. A., Nakagaki, W. R., Esteves, A., Rossi-Junior W. C., Fernandes, G. J. M., Guerra, F. D., & Soares, E. A. (2015). Efeitos do consumo de etanol e da desintoxicação alcóolica sobre a biomecânica e morfologia óssea em fêmur de ratos. *Revista Brasileira de Biologia*, 75 (4), 983-988. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.04814>

Haddad, P. T., Salazare, M., & Hernandes, L. (2015). Histomorfometria da matriz orgânica do fêmur de ratas ovariectomizadas tratadas com alendronato de sódio. *Revista Brasileira de Ortopedia*, 50 (1), 100–104. Recuperado de <http://rbo.org.br/detalhes/1993/pt-BR/histomorfometria-da-matriz-organica-do-femur-de-ratas-ovariectomizadas-tratadas-com-alendronato-de-sodio>

Hau, J., & Shapiro, S. J. (1994). *Handbook of laboratory animal science*. Boca Raton: CRC Press.

Horvath, R. O., Silva, T. D., Neto, J. C., Nakagaki, W. R., Garcia, J. A. D., & Soares, E. A. (2011). Efeitos do alcoolismo e da desintoxicação alcóolica sobre o reparo e biomecânica óssea. *Acta Ortopédica Brasileira*, 19 (5), 305-308. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/657/65721019008.pdf>

Lammers, A. R., German, R. Z., & Lightfoot, P. S. (1998). The impact of muscular dystrophy on limb bone growth and scaling in mice. *Acta Anatomica*, 162 (4), 199-208. doi: 10.1159/000046435

Mandarim-de-Lacerda, C. A. (1995). *Métodos Quantitativos em Morfologia*. Rio de Janeiro: Eduerj.

Oliveira, A. C. B., Oliveira, A. P., Guimarães, A. L., Oliveira, R. A., Silva, F. S., Reis, S. A. G. B., Ribeiro, L. A. A., & Almeida, J. R. G. S. (2013). Avaliação toxicológica pré-clínica do

chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 15 (2), 244-249. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000200012>

Oppermann-Lisbon, K., & Wannmacher, L. (2001). Reposição hormonal na menopausa: benefícios e riscos. *Reprodução e Climatério*, 16(1), 11-19.

Palencia, G., Teixeira, F., Ortiz, R., Perez, R., Rios, C., & Sotelo, J. (1994). Detrimental effects of malnutrition on the damage induced by alcoholism: a study of animal models that simulate chronic alcoholism and malnutrition of large human groups. *Journal of Studies on Alcohol*, 55 (1), 113-120. doi: 10.15288/jsa.1994.55.113

Santos, P. N., Paz, F. A. N., Santos, E. N., Batista, N. J. C., Carvalho, T. M., & Costa, C. L. S. (2020). Análise do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico do extrato hidroalcoólico das folhas da *Morus nigra* L. através do bioensaio *Allium cepa*. *Research, Society and Development*, 9 (4), e132942968. Recuperado de <https://rsd.unifei.edu.br/index.php/rsd/article/view/2968/2317>

Silva, I. O., Santos, I. C., Peters, V. M., Faria, R. E., & Andrade, A. T. L. (2007). Avaliação do potencial estrogênico de *Morus* sp em ratas Wistar. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, 26 (1-2), 19-23. Recuperado de <http://docplayer.com.br/32415969-Avaliacao-do-potencial-estrogenico-de-morus-sp-em-ratas-wistar-estudo-histologico-e-histomorfometrico.html>

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., & Petrovick, P. R. (2007). *Farmacognosia: da planta à medicina*. Porto Alegre: UFRGS.

Song, W., Wang, H. J., Bucheli, P., Zhang, P. F., Wei, D. Z., & Lu, Y. H. (2009). Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (19), 9133–9140. doi: 10.1021/jf9022228

Tanaka, M., Sadakazu, E., Shoji, K., & Hidehiro, O. (1998). The effect of aging and ovariectomy on mandibular condyle in rats. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 79 (6), 685-90. doi: 10.1016/s0022-3913(98)70076-9



Volpato, G. T., Damasceno, D. C., Calderon, I. M. P., & Rudge, M. V. C. (2002). Revisão de plantas Brasileiras com comprovado efeito hipoglicemiante no controle do diabetes *mellitus*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 4 (2), 35-45. Recuperado de <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/66787/2-s2.0-0036087777.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Weisbroth, S. H., Paganelli, R. G., & Salvia, M. (1977). Evaluation of a disposable water system during shipment of laboratory rats and mice. *Laboratory Animal Science*, 27 (2), 186-194.

### **Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Pedro Alberto Ferreira Cavichioli – 20%

Thiago Donizeth da Silva – 10%

André Luiz Thomaz de Souza – 10%

Flávia da Ré Guerra – 10%

Alessandra Esteves – 10%

Wagner Costa Rossi Junior – 10%

José Antônio Dias Garcia – 10%

Evelise Aline Soares – 20%