

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DOS EXTRATOS DA *Morus Nigra L.* (amora)  
NO PESO CORPORAL E TECIDUAL DE ANIMAIS NA MENOPAUSA**

**EVALUATION OF THE EFFECTS OF EXTRACTS OF *Morus Nigra L.*  
(blackberry) ON BODY AND TISSUE WEIGHT OF ANIMALS IN  
MENOPAUSE**

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE EXTRACTOS DE *Morus Nigra L.*  
(mora) SOBRE EL PESO CORPORAL Y TEJIDO DE ANIMALES EN  
MENOPAUSIA**

Taysa Mendonça Silva<sup>1</sup>

Centro Universitário Dom Bosco, São Luís, Maranhão

Igor Inácio Aragão<sup>2</sup>

Centro Universitário Dom Bosco, São Luís, Maranhão

Vitória Nunes de Brito<sup>3</sup>

Centro Universitário Dom Bosco, São Luís, Maranhão

Anny Luísa Bonfim Lisboa<sup>4</sup>

Centro Universitário Dom Bosco, São Luís, Maranhão

Haissa Oliveira Brito<sup>5</sup>

Centro Universitário Dom Bosco, São Luís, Maranhão

**RESUMO**

<sup>1</sup> Aluna de Medicina. Centro Universitário Dom Bosco. E-mail: taysamendoncas@outlook.com.

<sup>2</sup> Aluno de Medicina. Centro Universitário Dom Bosco. E-mail: igorinacioaragao@gmail.com.

<sup>3</sup> Aluna de Medicina. Centro Universitário Dom Bosco. E-mail: vitoriabrito3197@gmail.com.

<sup>4</sup> Aluna de Medicina. Centro Universitário Dom Bosco. E-mail: annyluisab@gmail.com.

<sup>5</sup> Docente do curso de Medicina da UNDB. Especialista em Biologia Celular e Tecidual (UFPR). Mestre e Doutora em Farmacologia (UFPR). E-mail: haissa.brito@undb.edu.br.

Conceitos abordados: A menopausa consiste na transição da fase reprodutiva da mulher para a não reprodutiva, com o declínio gradual da função ovariana e a instalação da menopausa. O diagnóstico da menopausa é determinado pelo último fluxo menstrual seguido de doze meses de amenorreia, constituindo um evento que ocorre durante o climatério. Objetivo: Avaliar os efeitos do uso da *Morus nigra* L. no peso corporal, uterino e adiposo em animais com hipoestrogenismo. Metodologia: As camundongas fêmeas foram divididas em três grupos controles: falso-operados (SHAM) ; ooforectomizadas (OOF), que receberam 0,1mL/100g de solução salina, ooforectomizadas (OOF+SAL) tratadas com solução estroprogestativa (OOF+EP-50µg/Kg); e 3 grupos teste: tratadas EH de *M. nigra* nas doses de 100, 250 e 500mg/kg, (OOF100,OOF250 e OOF500) diariamente, por v.o., durante 15 dias. Os animais foram submetidos à cirurgia de retirada dos ovários ou não e após a confirmação dos anestro, os animais foram submetidos ao tratamento. O peso corporal dos animais foi acompanhado e após isso, os animais foram anestesiados e retirados os cornos uterinos e tecido adiposo generalizado para serem pesados em balança analítica. Resultados: Os animais tratados nas doses de 100 e 500 mg/kg reduziram o peso corporal dos animais e estes mesmos animais apresentaram redução do peso do tecido adiposo. O peso uterino dos animais tratados com o extrato nas doses de 100 e 250 foi reduzido. Conclusão: Os extratos da *Morus Nigra* L. preveniram o aumento de peso e acúmulo do tecido adiposo associado à menopausa e reduziram o peso uterino.

Palavras-chave: *Morus nigra* L. Peso corporal. Peso uterino. Peso tecido adiposo. Menopausa.

## ABSTRACT

Concepts covered: Menopause consists of the transition from a woman's reproductive to non-reproductive phase, with the gradual decline of ovarian function and the onset of menopause. The diagnosis of menopause is determined by the last menstrual flow followed by twelve months of amenorrhea, constituting an event that occurs during the climacteric. Objective: To evaluate the effects of the use of *Morus nigra* L. on body, uterine and adipose weight in animals with

hypoestrogenism. Methodology: Female mice were divided into three control groups: sham-operated (SHAM); oophorectomized (OOF), who received 0.1mL/100g of saline solution, oophorectomized (OOF+SAL) treated with estroprogestational solution (OOF+EP-50µg/Kg); and 3 test groups: treated M. nigra HE at doses of 100, 250 and 500mg/kg, (OOF100, OOF250 and OOF500) daily, by v.o., for 15 days. The animals underwent surgery to remove the ovaries or not and after confirmation of anestrus, the animals underwent treatment. The body weight of the animals was monitored and after that, the animals were anesthetized and the uterine horns and generalized adipose tissue were removed to be weighed on an analytical balance. Results: The animals treated at doses of 100 and 500 mg/kg reduced the body weight of the animals and these same animals showed a reduction in the weight of adipose tissue. The uterine weight of animals treated with the extract at doses of 100 and 250 was reduced. Conclusion: Morus Nigra L. extracts prevented weight gain and adipose tissue accumulation associated with menopause and reduced uterine weight.

Keywords: More nigra L. Body weight. uterine weight. Fat tissue weight. Menopause.

## RESUMEN

Conceptos tratados: La menopausia consiste en la transición de la fase reproductiva de la mujer a la no reproductiva, con la disminución gradual de la función ovárica y el inicio de la menopausia. El diagnóstico de menopausia se determina por el último flujo menstrual seguido de doce meses de amenorrea, constituyendo un evento que ocurre durante el climaterio. Objetivo: Evaluar los efectos del uso de Morus nigra L. sobre el peso corporal, uterino y adiposo en animales con hipoestrogenismo. Metodología: Los ratones hembra se dividieron en tres grupos de control: con operación simulada (SHAM); ooforectomizadas (OOF), que recibieron 0,1mL/100g de solución salina, ooforectomizadas (OOF+SAL) tratadas con solución estroprogestacional (OOF+EP-50µg/Kg); y 3 grupos de prueba: trataron M. nigra HE a dosis de 100, 250 y 500 mg/kg, (OOF100, OOF250 y OOF500) diariamente, por v.o., durante 15 días. Los animales se sometieron a cirugía para extirpar o no los ovarios y después de la

confirmación del anestro, los animales se sometieron a tratamiento. Se controló el peso corporal de los animales y posteriormente se anestesiaron los animales y se extrajeron los cuernos uterinos y el tejido adiposo generalizado para pesarlos en una balanza analítica. Resultados: Los animales tratados a las dosis de 100 y 500 mg/kg redujeron el peso corporal de los animales y estos mismos animales mostraron una reducción del peso del tejido adiposo. Se redujo el peso uterino de los animales tratados con el extracto a las dosis de 100 y 250. Conclusión: Los extractos de *Morus Nigra* L. previnieron el aumento de peso y la acumulación de tejido adiposo asociado a la menopausia y redujeron el peso uterino.

Palabras clave: Más negra L. Peso corporal. peso uterino. Peso del tejido graso. Menopausia.

## 1 INTRODUÇÃO

As alterações hormonais vivenciadas durante o climatério, tais como a diminuição do 17- $\beta$ -Estradiol e o aumento do hormônio folículo-estimulante provocam várias modificações no corpo, elevando o risco para o desenvolvimento de várias enfermidades (MOREIRA,2014). Os sintomas mais comumente apresentados incluem fogachos, suores noturnos, palpitações e cefaleias. Somam-se mudanças no metabolismo ósseo, cardiovascular e manifestações psicológicas como a depressão, irritabilidade, fadiga e perda da libido (MALHEIROS, 2014; BLUMEL,2000; DEMETRIO,2001).

No Brasil, o chá de folhas de amora é largamente empregado na medicina popular como repositor hormonal durante o climatério, objetivando o alívio dos sintomas, principalmente dos fogachos. Os resultados obtidos por uma pesquisa etnofarmacológica confirmaram a utilização de *M. nigra* L. foi eficaz para o tratamento de sintomas do climatério, com apreciável consenso de uso popular (maior que 50%), podendo constituir um potencial produto natural medicinal para estudos químicos e farmacológicos, especialmente como fonte de substâncias com atividade estrogênica.

Popularmente, as pacientes já utilizam essa planta para diversos fins. Porém, há necessidade de comprovação científica de que a utilização da planta é segura e com baixa incidência de efeitos adversos.

Baseado nisso, o objetivo geral do trabalho foi de avaliar o efeito do tratamento crônico com extratos de *Morus nigra L.* no peso corporal e de órgãos periféricos de animais na menopausa. Mais especificamente, acompanhar o peso corporal dos animais tratados e seus efeitos sobre o peso uterino e peso do tecido adiposo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A análise das três espécies de amoras, *M. alba*, *M. rubra* e *M. nigra*, demonstrou que a amora preta apresenta maior conteúdo fenólico e flavonoídico que as demais (ERCISLI, 2008). Quanto aos estudos experimentais, alguns têm relatado o possível potencial estrogênico de *M. nigra* em ratas Wistar ooforectomizadas (QUEIROZ, 2012). Em ratas Wistar ooforectomizadas submetidas ao tratamento crônico com o extrato hidroalcoólico de *M. nigra* ocorreu prevenção da atrofia vaginal e uterina, além da melhora do perfil lipídico das ratas .

Em outro estudo realizado, ratas prenhas tratadas cronicamente via oral com extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* não exibiu nenhuma atividade estrogênica ou efeito tóxico no sistema reprodutivo desses animais ou desenvolvimento embrionário (QUEIROZ, 2012).

Várias atividades farmacológicas relacionadas aos componentes das plantas do gênero *Morus* já foram descritas, como a capacidade para alterar a expressão genética e atividade anti-carcinogênica devido à presença de substâncias fenólicas e  $\beta$ -sitosterol (TAPIERO, 2002; NAKAMURA, 2003; AWAD, 2005). Alguns flavonóides têm sido relatados como possuindo atividade estrogênica, tais como quercetina, com ação anti-inflamatória e anticarcinogênica (SEERAM, 2001).

## 3 METODOLOGIA

## Animais

Foram utilizados ratas fêmeas (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, pesando entre 180-220 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água.

Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas com os protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFMA) e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o Protocolo de número no. **23115.003777/2017-91**.

O primeiro grupo de experimentos teve como objetivo padronizar a técnica de indução de fogachos no laboratório. Após atingirmos a padronização adequada, fomos avaliar o efeito do tratamento crônico com o extrato da amora em modelo de ondas de calor em camundongos na menopausa. Primeiramente, os animais foram ovariectomizados ou não. Após a confirmação do anestro, os animais iniciaram a sessão de exercício físico forçado durante 3 semanas. Na quarta semana, foi realizada o experimento em si para testar os extratos em diferentes doses. Os animais serão distribuídos de acordo com esses grupos:

- Falso-Operado tratado com salina
- Ovariectomia tratado com veículo
- Ovariectomia tratado com estroprogestativo, 1 mg/kg, v.o.
- Ovariectomia tratado com extrato *M.nigra* dose 100 mg/kg
- Ovariectomia tratado com extrato *M.nigra* dose 250 mg/kg
- Ovariectomia tratado com extrato *M.nigra* dose 500 mg/kg

Segue abaixo a descrição dos procedimentos que foram utilizados:

**Material botânico e Preparação do extrato hidroalcolóico:** Folhas da espécie *Morus nigra* foram coletadas no Sul do Maranhão, Município de Sucupira do Norte – Brasil. Uma amostra da planta foi encaminhada ao Herbário Ático Seabra da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), onde foi identificada e catalogada sob o número 1627.

Após a coleta, as folhas foram secas em temperatura ambiente, pulverizadas em moinho para obtenção do pó. O pó foi submetido a processo de extração (maceração), durante 48 horas, com etanol 70%, na proporção de 1:3 v/v, e filtrado. Este procedimento foi repetido três vezes e o filtrado das três extrações foi reunido, concentrado em rotaevaporador e denominado extrato hidroalcolico (EH). Para determinação do peso seco e rendimento foram utilizadas três alíquotas de 1ml do EH, separados, em três frascos previamente tarados. As alíquotas foram evaporadas sob corrente de ar quente e, em seguida, os frascos resfriados e pesados em balança analítica digital. Esta operação foi repetida diversas vezes até a obtenção de pesos constantes. A concentração obtida do extrato foi de 242 ng/ml.

Os animais foram previamente anestesiados com cetamina/xilasina (60/7,5 mg/kg, ip) e logo em seguida foi realizada uma assepsia da região ventral dos animais (supra-púbica) para posterior laparotomia de aproximadamente 2 cm na linha mediana. Os ovários e as trompas foram identificados, as trompas foram ligadas com fio de sutura e os ovários isolados e retirados após a ligadura. Posteriormente, a incisão foi suturada. Após 21 dias foi feita a comprovação do anestro através do esfregaço vaginal. Animais falso-operados foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico mas os ovários e as trompas permaneceram intactos.

**Determinação do peso corporal dos animais:** Durante todo o período após a ooforectomia e tratamento foi realizado o controle de peso corporal das ratas. Os animais foram pesados três vezes por semana para a determinação do volume das drogas que foram administradas, bem como o ganho de massa corpórea.

**Determinação do peso uterino e do tecido adiposo:** Sob anestesia com cetamina (60 mg/kg) e xilazina (7,5 mg/kg), via intraperitoneal, após verificação de ausência de percepção de estímulo doloroso e reflexo muscular, os animais foram devidamente posicionados, o intestino foi rebatido para melhor exposição dos cornos uterinos que foram isolados em conjunto e retirados em toda sua extensão para determinação do peso úmido em balança analítica. O tecido adiposo foi retirado de todo o corpo do animal sem especificação do tipo de tecido adiposo para determinação do peso úmido em balança analítica.



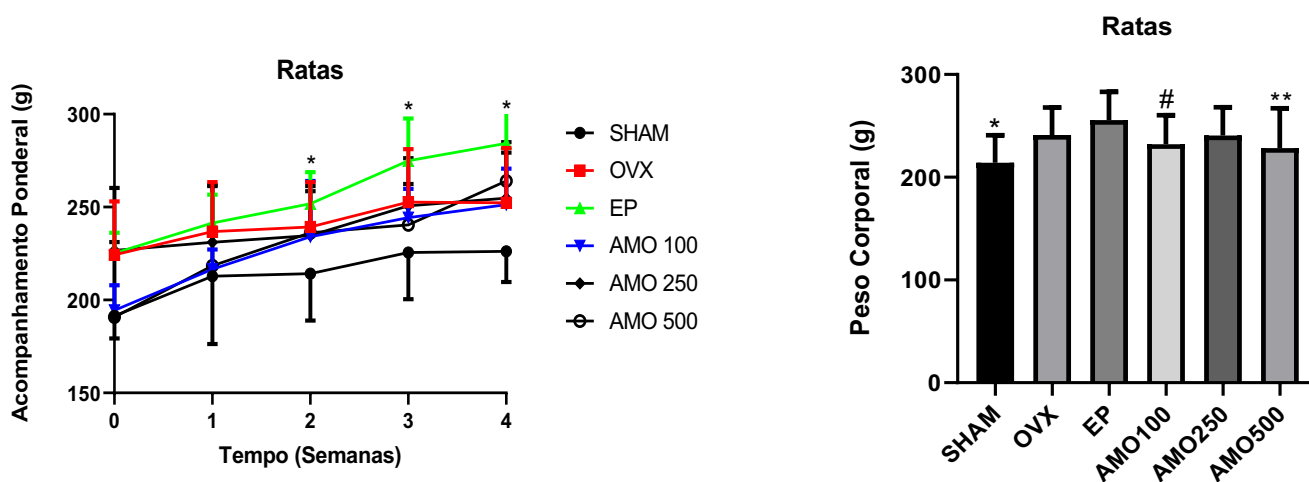
## Análise estatística

One-way ANOVA seguido do teste de Newman-Keuls foi utilizado para se analisar a diferença entre as análises bioquímica e os dados do ciclo estral foi demonstrado no formato de frequência. Foram consideradas significativas os dados com nível de significância de  $p < 0,05$ . Todas as analyses foram feitas utilizando GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como esperado, a ooforectomia promoveu um importante aumento gradativo a medida que o peso foi sendo acompanhado, em relação ao grupo falso-operado. Já o tratamento com estro-progestativo promoveu um aumento a medida que as semanas foram evoluindo, entretanto, de maneira geral, este aumento não foi significativo. Este aumento induzido pela ovariectomia tratado com estroprogestativo foi revertido pelo tratamento com o extrato da M.nigra nas doses de 100 e 500mg/kg . Não foi verificado diferença no que diz respeito à dose do extrato de 250 mg/kg .

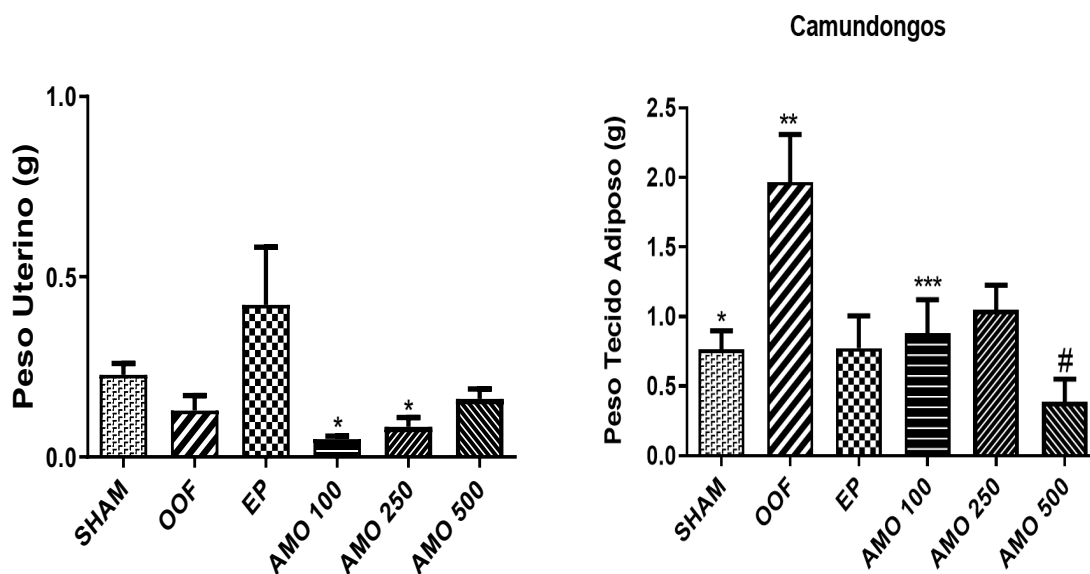
**Fig. 5. Acompanhamento ponderal e peso corporal de camundongos.** SHAM: ratas com gônadas intactas que receberam apenas o veículo (controle); OVX: camundongos ovariectomizados tratadas com salina; EP: camundongos ovariectomizados tratadas com estroprogestativo; AMO100, AMO250 e AMO500: camundongos ovariectomizados tratados com extratos da M.nigra em diferentes doses. durante 15 dias. Os pontos e barras verticais representam a média  $\pm$  erro padrão das médias de 8 - 10 animais por grupo experimental.





\*Diferença estatística em relação à EP. Em relação aos gráficos em barra de peso corporal.\* Diferença estatística em relação à OVX, EP E AMO 250, # Diferença estatística em relação à EP, \*\* Diferença estatística em relação à EP. Fonte: Brito (2021).

**Fig.6. Peso uterino e do tecido adiposo total. Animais** com gônadas intactas que receberam apenas o veículo (controle); OVX: camundongos ovariectomizados tratadas com salina; EP: camundongos ovariectomizados tratadas com estroprogestativo; AMO100, AMO250 e AMO500: camundongos ovariectomizados tratados com extratos da *M.nigra* em diferentes doses. durante 15 dias. Os pontos e barras verticais representam a média  $\pm$  erro padrão das médias de 8 - 10 animais por grupo experimental.



\* Diferença em relação ao EP. Em relação ao gráfico de peso do tecido adiposo, Diferença em relação OVX \*\* Diferença em relação EP \*\*\*Diferença em relação OVX # Diferença em relação OVX.  
Fonte: Brito (2021).

Conforme esperado, os animais falso-operados apresentaram um menor peso do tecido adiposo quando comparado com os animais ovariectomizados. Tal acúmulo desse tecido foi revertido com o uso de estro-progestativo de maneira significativa. Dentre o tratamento dos animais com as três doses do extrato, somente duas, as de 100 e 500 mg/kg reduziram o acúmulo de tecido adiposo induzido pela ovariectomia de maneira significativa.

Um dos importantes efeitos do climatério sobre a saúde das mulheres é o progressivo ganho de peso, relacionado fundamentalmente com a deposição de tecido adiposo e o desenvolvimento de obesidade. Este é um fenómeno com consequências negativas para a saúde cardiovascular, aumentando o risco de lesões isquémicas como o enfarte do miocárdio e os acidentes vasculares cerebrais (LUMSDEN E SASSARINI, 2019; SRIVARATHARAJAH E ABRAMSON, 2019). A obesidade aumenta também o risco de desenvolver diabetes (MANCUSO E BOUCHARD, 2019) e, de acordo com observações recentes, aumenta o risco de vários tipos de câncer, especialmente de cânceres com elevada incidência como o do cólon e o da mama.

Os presentes resultados constituem as primeiras indicações de que a folha de *Morus nigra* possui a capacidade de bloquear a deposição de tecido adiposo decorrente da perda de função ovárica. De fato, enquanto os animais não tratados exibiram um marcado aumento de peso e, especificamente, do tecido adiposo visceral, os animais tratados com *Morus nigra* exibiram valores significativamente mais baixos e semelhantes aos dos animais sham-operados ou tratados com estro-progestagénio. Estudos anteriores realizados com extractos de folhas de *Morus nigra* também observaram um significativo efeito anti-lipidémico e hepatoprotector num modelo de hiperlipidémia induzida pelo Triton WR-1339 em ratos Wistar machos (ZENI et al., 2017). Os autores deste estudo atribuíram o efeito anti-lipidémico observado aos ácidos polifenólicos de *Morus nigra*, especialmente ao ácido clorogénico. No presente estudo, a variedade de parâmetros fisiológicos e anatómicos estudados confirma que a *Morus nigra* exibe acção anti-lipidémica mas modifica também outros aspectos relacionados com a menopausa. O extracto de *Morus nigra* exibiu um efeito dose-dependente sobre o peso uterino. Em particular, a dose mais alta de extracto utilizada permitiu preservar o peso do útero, que foi ligeiramente superior ao observado em ratas ovariectomizadas, não revelando a hipertrofia induzida pelos estro-progestagénios.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o presente trabalho, sugerimos então que as frações 100 e 500 mg/kg de *M. nigra* são eficazes em evitar o aumento do peso corporal e acúmulo de tecido adiposo associado ao climatério e reduz o peso uterino.

## REFERÊNCIAS

- AWAD AB, BURR AT, FINK CS. Effect of resveratrol and beta-sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**. 2005 Mar;72(3):219-26.
- BLUMEL JE, CASTELO-BRANCO C, BINFA L, GRAMEGNA G, TACLA X, ARACENA B, ET AL. Quality of life after the menopause: a population study. **Maturitas**, 2000, Jan 15;34(1):17-23.
- DEMETRIO FNVF, A. H. G. Efeito da terapia de reposição estrogênica no humor em mulheres menopausadas. **Revista de Psiquiatria Clínica**, 2001,28(2): 72-88.
- ERCISLI S, ORHAN E. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey, **Scientia Horticulturae**. 2008 3/10/;116(1):41-6
- LUMSDEN & SASSARINI. The evolution of the human menopause. **Climacteric**, 2019,22;111-116.
- MANCUSO & BOUCHARD. The impact of aging on adipose function and adipokine synthesis. **Front Endocrinol**, 2019,10;137.
- MOREIRA AC, SILVA AM, SANTOS MS, SARDÃO VA. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, 2014, 9//;143(0):61-71.
- MALHEIROS ESDA, CHEIN MBDC, SILVA DSMD, DIAS CLL, BRITO LGO, PINTO-NETO AM, ET AL. Síndrome climatérica em uma cidade do Nordeste brasileiro: um inquérito domiciliar. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, 2014,36:163.
- NAKAMURA Y, WATANABE S, MIYAKE N, KOHNO H, OSAWA T. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **Journal of agricultural and food chemistry**, 2003, May 21;51(11):3309-12.
- SEERAM NP, MOMIN RA, NAIR MG, BOURQUIN LD. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**. 2001 Sep;8(5):362-9.

SRIVARATHARAJAH & ABRAMSON. Hypertension in menopausal women: The effect of estrogen. **Menopause**, 2019,26;428-430.

TAPIERO H, TEW KD, BA GN, MATHE G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedicine & pharmacotherapie**, 2002, Jun;56(4):200-7.

QUEIROZ GT, SANTOS TR, MACEDO R, PETERS VM, LEITE MN, SÁ RCS, GUERRA MO. Efficacy of *Morus nigra* L. on reproduction in female Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, 2012, 50: 816-822.

ZENI, ALB. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus Nigra* leaves extract. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2017,89;2805-2815.