



**JÉSSICA PETRINE CASTRO PEREIRA**

**EFEITOS ESTROGÊNICOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM  
EXTRATOS DE LINHAÇA (*Linum usatissimum*) E/OU  
AMOREIRA (*Morus nigra*) EM RATAS  
OVARIECTOMIZADAS.**

**Lavras - MG**

**2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS**

**JÉSSICA PETRINE CASTRO PEREIRA**

**EFEITOS ESTROGÊNICOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATOS DE  
LINHAÇA (*Linum usatissimum*) E/OU AMOREIRA (*Morus nigra*) EM RATAS  
OVARIECTOMIZADAS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Alterações Metabólicas e Alimentos Funcionais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Prof. Dr. Bruno Del Bianco Borges

**LAVRAS - MG**

**2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Pereira, Jéssica Petrine Castro.

Efeitos estrogênicos da suplementação com extratos de linhaça (*Linum usatissium*) e/ou amoreira (*Morus nigra*) em ratas ovariectomizadas. / Jéssica Petrine Castro Pereira. - 2019.  
84 p. : il.

Orientador(a): Bruno Del Bianco Borges.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Fitoestrógenos. 2. Menopausa. 3. Metabolismo. I. Borges, Bruno Del Bianco. II. Título.

**JÉSSICA PETRINE CASTRO PEREIRA**

**EFEITOS ESTROGÊNICOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM EXTRATO DE  
LINHAÇA (*Linum usatissimum*) E/OU AMOREIRA (*Morus nigra*) EM RATAS  
OVARIECTOMIZADAS.**

**ESTROGENIC EFFECTS OF SUPPLEMENTATION WITH EXTRACT FLAXSEED  
(*Linum usatissimum*) AND/OR MULBERRY (*Morus nigra*) IN OVARIECTOMIZED  
RATS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, área de concentração em Alterações Metabólicas e Alimentos Funcionais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 09 de Julho de 2019

Dr. Bruno Del Bianco Borges - UFLA

Dr. Michel Cardoso de Angelis Pereira - UFLA

Dra. Lidiane Orlandi - UNILAVRAS

Orientador

Prof. Dr. Bruno Del Bianco Borges

**LAVRAS - MG**

**2019**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e à Nossa Senhora por me conceder sabedoria na escolha do melhor caminho, força e coragem para acreditar no meu potencial.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Departamento de Ciência da Saúde, pela oportunidade.

À Fundação de Amparo e Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao meu professor Bruno Del Bianco Borges, pela orientação, paciência, dedicação, por não medir esforços e por sempre ter algo a acrescentar. E por fazer encarar meus medos e apaixonar pela pesquisa com o sistema reprodutor feminino.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Lidiane e Michel, pelo interesse e disponibilidade.

Às minhas ratinhas, parte fundamental desse trabalho, por contribuírem com a ciência, e saibam que nunca me esquecerei de vocês.

À minha irmã Fernanda Aparecida Castro Pereira, que sempre esteve disposta a me ajudar, dar conselhos, dicas, principalmente com a parte estatística e ser minha melhor amiga a todo momento.

Aos meus queridos e amados, pais, Antônio Inácio Pereira (Tonhão) e Carmilene Chagas de Castro (Branca), pelo amor, carinho, paciência, confiança, ajuda (da minha mãe) e grande motivação para eu alcançar meus sonhos.

Ao meu namorado, Bruno, uma pessoa incrível que conheci no mestrado, por sua dedicação, amor, respeito e muita alegria. Às crianças, que sou apaixonada, Benício, Davi e Alice, e à sua família que me acolheu tão bem.

À minha família querida, tias, primos, principalmente Dani com suas filhas, Ana Clara (minha primeira afilhada) e Lulu, agradeço por tanto amor, apoio, conversas e carinho.

A todos funcionários do Departamento de Ciências da Saúde/UFLA, professores, secretárias, técnicos, faxineiros. À Erika, pela ajuda, colaboração e parceria, Joelson (biotério) também por toda ajuda e disposição. Ao William, técnico da fisiologia, que sempre esteve disposto ajudar, auxiliar e passar seus infinitos conhecimentos. Ao professor Michel Cardoso de Angelis Pereira, por ceder o laboratório de Nutrição para realização das extrações e me passar tanto conhecimento, auxílio e por ser uma pessoa tão humana, também agradeço ao técnico do laboratório de Nutrição, Geraldo, por toda ajuda. Aos professores Luciano José Pereira e Márcio Zangeronimo, por cederem o laboratório de fisiologia para a realização dos

experimentos. Ao técnico da histologia, Isaac, obrigada pela ajuda, paciência e auxílio nos cortes dos blocos de parafina, principalmente com os fígados e também à nova técnica, Aline, conheci há pouco tempo, mas já foi de grande apoio e ajuda no momento que mais precisei. Aos professores, Rafael Remédio, José Rafael e Josi Seixas pelas dicas e auxílio com a parte histológica. Agradeço também, Pedro e Tamara, pela ajuda com as análises bioquímicas, por serem pacientes e amigos, e também, à professora Silvana por ceder o laboratório de Bioquímica para realização das análises, e passar seu conhecimento.

Aos amigos que fiz nesses dois anos de Mestrado, agradeço pelos momentos de muitos estudos, aprendizado, alegrias, amizade e apoio nos momentos difíceis.

A todos que agradei acima, vocês foram imprescindíveis para a realização e conclusão desse trabalho, serei eternamente grata!

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

Os estrógenos são hormônios esteroides produzidos principalmente pelos ovários e tem ação no crescimento e desenvolvimento de órgãos reprodutivos, dentre outros. A partir da quinta década de vida da mulher, há diminuição da função ovariana e conseqüentemente da concentração plasmática de estrógeno, levando à menopausa. Uso de hormônios sintéticos são a primeira escolha para redução dos sinais e sintomas da menopausa, porém há muitas restrições. Com isso, o uso de substâncias naturais, como os fitoterápicos, tem se tornado bastante comum. Os fitoterápicos possuem diversos tipos de componentes, dentre eles, os chamados fitoestrógenos. Estes constituem um grupo de compostos não esteroidais encontrados em diversos vegetais e são conhecidos por mimetizar ou modular a ação estrogênica. Dentre estes alimentos, a linhaça e o chá de amoreira tem demonstrado eficácia no tratamento de alguns transtornos da menopausa. Assim, o presente trabalho teve como objetivo verificar efeitos estrogênicos da suplementação com extratos de linhaça e/ou amoreira sobre o sistema reprodutor, metabólico, ósseo e comportamental de animais ovariectomizados. Foram utilizadas 32 ratas fêmeas Wistar adultas, com média de peso  $210g \pm 10$ , ovariectomizadas, divididas em cinco grupos: a) tratados com salina (salina); b) tratados com estrógeno (estrógeno); c) tratados com extrato de linhaça (linhaça); d) tratados com extrato de amoreira (amora); e) tratados com extratos de linhaça e de amoreira (composto). Todos os grupos receberam tratamentos por via oral, durante 60 dias, por gavagem, com volume aproximado de  $500 \mu\text{l}/\text{animal}$ , e a cada semana os animais eram pesados. Após o tratamento, as ratas foram submetidas ao teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), depois eutanasiadas no período da manhã e realizado o lavado vaginal. Foram coletadas amostras de sangue dos animais por punção cardíaca, para análises das concentrações plasmáticas de: colesterol total e frações, triacilgliceróis (TAG), lipase, ácido úrico, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP). Foram coletados: hipófise, fígado, útero e fêmur. A hipófise foi pesada. O fígado e útero foram seccionados e fixados em solução de formalina à 10%. Já o fêmur foi retirado todo tecido mole e descalcificado e posteriormente seccionado. Análises histomorfométricas foram realizadas da parede uterina e fêmur, e para as amostras de fígado realizou-se análise histopatológica. As soluções dos extratos de linhaça e amoreira foram submetidas à quantificação do teor de fenólicos totais e análise antioxidante. Os dados foram submetidos às análises de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos foram agrupados pelo teste de Scott-Knott à 5% de probabilidade. As análises foram geradas pelo programa R e os gráficos no programa Prisma. Como resultados, verificou que a porcentagem de inibição do extrato de linhaça em sequestrar o radical DPPH foi de 74,55% e do extrato de amoreira de 73,44%. Somente o extrato de amoreira apresentou atividade antioxidante pelo sistema beta-caroteno/ácido linoleico no valor de 44,77%, já do extrato de linhaça, não foi possível quantificar. O extrato de amoreira apresentou teor de fenólicos totais ( $1482,6 \pm 37 \text{ mg EAG}/100\text{g}$  de extrato) e o extrato de linhaça ( $1395,4 \pm 11 \text{ mg EAG}/100\text{g}$  de extrato). Os grupos tratados com estrógeno e extratos de linhaça, amoreira e composto tiveram menor ganho de peso durante o tratamento e maior peso hipofisário em relação aos animais tratados com salina. No LCE, os animais submetidos aos diferentes tratamentos, não diferiram entre si, quanto ao tempo de permanência e frequência de entrada nos braços abertos. Os animais tratados com estrógeno e extratos apresentaram células epiteliais da mucosa vaginal no lavado vaginal, enquanto os animais tratados com salina apresentaram grande quantidade de leucócitos. Os animais que receberam estrógeno e extratos de linhaça, amoreira e composto exibiram redução nas concentrações plasmáticas de colesterol, LDL e lipase, e somente o grupo tratado com estrógeno e composto apresentaram valores reduzidos de VLDL e TAG em relação aos animais tratados com salina. As concentrações plasmáticas de HDL, ácido úrico, TGO e TGP não apresentaram diferenças entre os tratamentos. Os animais que foram tratados com estrógeno, e extratos de linhaça, amoreira e composto, exibiram espessura endometrial maior e porcentagem elevada de trabéculas intactas em comparação ao grupo salina. Por meio da análise histopatológica do fígado, observou-se que os animais tratados com salina possuíam maior número de alterações hepáticas em relação aos outros tratamentos. Com base nestes dados, sugere-se que a suplementação com os extratos de linhaça e/ou amoreira promoveu efeitos benéficos ao organismo sem ação estrogênica. Sendo assim, pode-se prever uma alternativa e/ou complemento eficaz para controlar os efeitos causados pela diminuição da ação estrogênica.

**Palavras-chave:** Fitoestrógenos; menopausa; osteoporose; metabolismo.

## ABSTRACT

Estrogens are steroid hormones produced mainly by the ovaries and have the action in the growth and development of reproductive organs, among others. From the fifth decade of life of women, there is a decrease in ovarian function and consequently the plasma concentration of estrogen, leading to menopause. Uses of synthetic hormones are the first choice for reducing the signs and symptoms of menopause, however, there are many restrictions. With this, the use of natural substances, such as herbal medicines, has become quite common. Phytotherapy has several types of components, among them so-called phytoestrogens. These constitute a group of non-steroidal compounds found in various plants and are known to mimic or modulate estrogenic action. Among these foods, flaxseed and mulberry tea have been shown to be effective in treating some menopausal disorders. The objective of the present study was to verify the estrogenic effects of supplementation with flaxseed and/or mulberry extracts on the reproductive, metabolic, bone and behavioral systems of ovariectomized animals. Thirty-two adult female Wistar rats, weighing  $210\text{g} \pm 10$  on average, ovariectomized were divided into five groups: a) treated with saline (saline); b) treated with estrogen (estrogen); c) treated with flaxseed extract (flaxseed); d) treated with mulberry extract (mulberry); e) treated with flaxseed and mulberry extracts (compound). All groups were orally treated for 60 days by gavage with approximately  $500\ \mu\text{l}/\text{animal}$ , and each week the animals were weighed. After treatment, the rats were submitted to the Elevated Plus Maze (EPM) test, then euthanized in the morning and performed vaginal smear. Blood samples from the animals were collected by cardiac puncture for analysis of plasma concentrations of total cholesterol and fractions, triacylglycerols (TAG), lipase, uric acid, glutamic-oxalacetic transaminase (GOT) and glutamic-pyruvic transaminase (GPT). The following were collected: pituitary, liver, uterus, and femur. The pituitary gland was weighed. The liver and uterus were sectioned and fixed in 10% formalin solution. The femur was removed from all soft tissue and decalcified and then sectioned. Histomorphometric analyzes were performed on the uterine wall and femur, and histopathological analysis was performed for the liver samples. The solutions of the flaxseed and mulberry extracts were submitted to the quantification of total phenolic content and antioxidant analysis. The data were submitted to analysis of variance by the F test and the means of the treatments were grouped by the Scott-Knott test at 5% probability. The analyses were generated by the R program and the graphs in the Prisma program. As results, it was verified that the percentage of inhibition of flaxseed extract in sequestering the DPPH radical was 74.55% and the mulberry extract was 73.44%. Only the mulberry extract presented antioxidant activity by the beta-carotene/linoleic acid system in the value of 44.77%, since the flaxseed extract, it was not possible to quantify. The mulberry extract presented total phenolic content ( $1482.6 \pm 37\ \text{mg EAG} / 100\text{g extract}$ ) and flaxseed extract ( $1395.4 \pm 11\ \text{mg EAG}/100\text{g extract}$ ). The groups treated with estrogen and extracts of flaxseed, mulberry, and compound had lower weight gain during treatment and higher pituitary weight compared to saline-treated animals. In the EPM, the animals submitted to the different treatments did not differ among themselves, regarding the length of stay and frequency of entry into the open arms. The animals treated with estrogen and extracts presented vaginal mucosal epithelial cells in the vaginal smear, while the saline-treated animals showed large amounts of leukocytes. Animals receiving estrogen and flaxseed, mulberry and compound extracts exhibited a reduction in plasma concentrations of cholesterol, LDL and lipase, and only the estrogen and compound treated groups showed reduced VLDL and TAG values in relation to saline-treated animals. Plasma concentrations of HDL, uric acid, GOT and GPT did not show differences between treatments. Animals that were treated with estrogen, and extracts of flaxseed, mulberry, and compound showed the greater endometrial thickness and a high percentage of intact trabecular compared to the saline group. Through the histopathological analysis of the liver, it was observed that the animals treated with saline had a greater number of liver changes in relation to the other treatments. Based on these data, it is suggested that supplementation with flaxseed and/or mulberry extracts promoted beneficial effects to the organism without estrogenic action. Thus, an alternative and/or effective complement may be provided to control the effects caused by the decrease in estrogenic action.

**Keywords:** Phytoestrogens; menopause; osteoporosis; metabolism.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Etapas sequenciais da extração do óleo de linhaça.....	24
Figura 2 - Ganho de peso (gramas) em 60 dias, dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira).....	35
Figura 3 - Porcentagem de tempo de permanência (A) e de entrada nos braços abertos (B) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira), submetidos ao LCE.....	36
Figura 4 - Fotomicroscopia (10X) das células presentes no lavado vaginal dos animais tratados com salina (A), estrógeno (B), extrato de linhaça (C), amoreira (D) e composto (linhaça + amoreira) (E). .....	36
Figura 5 - Peso da hipófise (gramas) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira).....	37
Figura 6 - Concentrações plasmáticas de Colesterol total (mg/dL) (A), triacilglicerol (TAG-mg/dL) (B), VLDL (mg/dL) (C), LDL (mg/dL) (D), HDL (mg/dL) (E), Lipase (U/L) (F) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira). .....	38
Figura 7 - Concentrações plasmáticas de ácido úrico (mg/dL) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira). .....	39
Figura 8 - Concentrações plasmáticas de TGO (UI) (A) e TGP (UI) (B) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira). .....	39
Figura 9 - Fotomicroscopia (HE; 10X) do endométrio dos animais tratados com salina (A), estrógeno (B), extrato de linhaça (C), amoreira (D) e composto (linhaça + amoreira) (E).....	41
Figura 10 - Comprimento endometrial ( $\mu\text{m}$ ) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira).....	42
Figura 11 - Fotomicroscopia (HE; 20X) do osso trabecular, da cabeça do fêmur dos animais tratados com salina (A), estrógeno (B), extrato de linhaça (C), amoreira (D) e composto (linhaça + amoreira) (E). .....	43
Figura 12 - Fotomicroscopia (HE; 20X) do osso trabecular, do colo do fêmur dos animais tratados com salina (A), estrógeno (B), extrato de linhaça (C), amoreira (D) e composto (linhaça + amoreira) (E). .....	44
Figura 13 - Porcentagem de osso trabecular, na cabeça (A) e no colo do fêmur (B) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto	

(linhaça + amoreira). .....	45
Figura 14 - Fotomicroscopia (HE; 10X e 20X) do fígado dos animais tratados com salina (A1/A2), estrógeno (B1/B2), extrato de linhaça (C1/C2), amoreira (D1/D2) e composto (linhaça + amoreira) (E1/E2).....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Curva de calibração de TGO.....	31
Tabela 2 - Curva de calibração de TGP.....	31
Tabela 3 - Capacidade antioxidante pela porcentagem de inibição da oxidação (DPPH e $\beta$ -caroteno/ácido linoleico) e Compostos Fenólicos Totais (CFT) dos extratos de linhaça e de amoreira.....	35
Tabela 4 - Resultados das análises histopatológicas do fígado dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira e composto (linhaça + amoreira). Adaptado de Kleiner et al. (2005).....	46

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	4
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	6
2.1 Fisiologia endócrina do sistema reprodutor feminino .....	6
2.2 Ação estrogênica no organismo.....	7
2.2.1 Ciclo Estral e Lavado Vaginal.....	9
2.3 Menopausa e redução da circulação estrogênica.....	9
2.5 Hormônios sintéticos .....	12
2.6 Fitoterápicos .....	13
2.7 Fitoestrógenos.....	14
2.7.1 Isoflavonas .....	15
2.7.2 Coumestanos.....	16
2.7.3 Lignanas.....	16
2.8 Linhaça ( <i>Linum usatissimum</i> ) .....	16
2.9 Amoreira ( <i>Morus nigra</i> ).....	17
2.10 Fenólicos Totais .....	19
2.11 Atividade Antioxidante .....	19
2.11.1 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH..	20
2.11.2 Autoxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoleico.....	20
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	22
3.1 Objetivo geral .....	22
3.2 Objetivos específicos .....	22
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
4.1 Apreciação ética .....	23
4.2 Animais.....	23
4.2.1 Grupos experimentais.....	23
4.3 Procedimento cirúrgico.....	23
4.3.1 Ovariectomia (OVX) bilateral.....	23
4.4 Obtenção e preparo das soluções administradas.....	23
4.4.1 Linhaça e amoreira .....	23
4.4.2 Estrógeno .....	25
4.5 Ensaio antioxidantes <i>in vitro</i> .....	25
4.5.1 Determinação da Atividade Antioxidante Total pela captura do radical livre DPPH.	25
4.5.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Sistema $\beta$ -caroteno/Ácido Linoleico ..	26
4.6 Quantificação do teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	27
4.7 Protocolos experimentais.....	27
4.7.1 Administração das soluções.....	27
4.7.2 Peso corporal dos animais .....	28
4.7.3 Teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE) .....	28

4.7.4 Eutanásia.....	28
4.7.5 Lavado vaginal .....	29
4.8 Peso hipofisário.....	29
4.9 Análises bioquímicas .....	29
4.9.1. Perfil lipídico.....	29
4.9.2 Ácido Úrico .....	30
4.9.3 Transaminase Glutâmico-Oxalacética (TGO).....	30
4.9.4 Transaminase Glutâmico-Pirúvica (TGP) .....	31
4.10 Coleta e clivagem do útero, fígado e fêmur .....	32
4.10.1 Útero e fígado.....	32
4.10.2 Fêmur .....	32
4.10.2.1 Descalcificação do fêmur com EDTA .....	32
4.11 Procedimentos do preparo histológico .....	32
4.12 Análise histomorfométrica do útero .....	33
4.13 Análise histomorfométrica óssea.....	33
4.14 Análise histopatológica do fígado.....	33
4.15 Análise estatística .....	34
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
5.1.1 Análise antioxidante e fenólicos totais.....	35
5.1.2 Ganho de peso.....	35
5.1.3 Teste labirinto em cruz elevado .....	36
5.1.4 Células presentes no lavado vaginal .....	36
5.1.5 Peso da hipófise .....	37
5.1.6 Perfil lipídico.....	38
5.1.7 Ácido úrico .....	39
5.1.8 TGO e TGP.....	39
5.1.9 Espessura endometrial.....	41
5.1.10 Porcentagem trabecular óssea (cabeça e colo do fêmur) .....	43
5.1.11 Histopatologia do fígado .....	46
<b>5.2 DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
5.2.1 Atividade Antioxidante Total.....	49
5.2.1.1 DPPH.....	49
5.2.1.2 Beta-caroteno/ácido linoleico .....	50
5.2.2 Fenólicos totais .....	51
5.2.3 Peso corporal .....	52
5.2.4 Análise comportamental .....	53
5.2.5 Lavado vaginal .....	55
5.2.6 Peso Hipofisário.....	55

<b>5.2.7 Perfil metabólico.....</b>	<b>56</b>
<b>5.2.7.1 Perfil lipídico.....</b>	<b>56</b>
<b>5.2.7.2 Ácido Úrico .....</b>	<b>59</b>
<b>5.2.7.3 TGO e TGP .....</b>	<b>59</b>
<b>5.2.8 Histomorfometria do útero.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2.9 Histomorfometria óssea .....</b>	<b>62</b>
<b>5.2.10 Análise Histopatológica.....</b>	<b>63</b>
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema reprodutor feminino é composto pelas gônadas femininas (ovários) e o trato genital feminino (constituído por tubas uterinas, útero e vagina). Esse sistema apresenta características estruturais e funcionais distintas em cada fase da vida: fetal, infantil, adulta (reprodutiva), climatério e senectude. Na fase fetal, ocorrem diferenciação e desenvolvimento do sistema reprodutor, bem como desenvolvimento folicular no ovário, contendo oócitos até a fase de folículo primordial. A fase adulta reprodutiva (*ou menacme*) é caracterizada por um processo cíclico de alterações hormonais, estruturais e funcionais conhecido como ciclo menstrual (AIRES, 2018).

Os estrógenos são hormônios esteroides, produzidos principalmente pelos ovários, com ação no crescimento e desenvolvimento de diversos órgãos e sistemas, sendo estes, relacionados diretamente ou não, ao sistema reprodutivo. Os hormônios estrogênicos, principalmente o  $17\beta$  estradiol, promovem a manutenção e desenvolvimento das mamas; deposição de tecido adiposo proporcionais no corpo feminino; alterações no trato genital feminino, como no epitélio vaginal e parede uterina; estabilidade óssea; controle de ingestão alimentar; dentre outros (MOREIRA et al. 2014). Entretanto, a partir da quarta década de vida da mulher ocorre diminuição da função ovariana e conseqüentemente da concentração plasmática de estrógeno.

A exaustão desta capacidade reprodutiva é marcada pela interrupção desse processo cíclico (menopausa) e estabelece a fase de senectude. Essa interrupção é precedida por uma fase transitória (climatério), marcada por irregularidades do ciclo menstrual e diminuição de fertilidade. Diversos tipos de sintomas podem ser observado em mulheres na menopausa, como por exemplo: ondas de calor, sudorese noturna, distúrbios emocionais e psicológicos não específicos, insônia, diminuição da função sexual e da libido, atrofia geniturinária, diminuição da lubrificação vaginal, riscos de fraturas ósseas e dores articulares (AGAN et al., 2015). Estes sintomas estão relacionados com a diminuição da secreção de estrógenos, e podem variar de acordo com a etnia, composição corporal, hábito de vida e o status social (LEE et al., 2012).

Com o fato da redução estrogênica na menopausa promover numerosos efeitos deletérios ao organismo, e com isso redução da qualidade de vida das mulheres, a indústria farmacêutica desenvolveu a terapia hormonal sintética, tornando-se assim, a primeira opção

de escolha para muitas mulheres que buscavam minimizar os desconfortos causados no período menopáusicos. Porém, existem muitas controvérsias à respeito do emprego da terapia hormonal em relação aos seus riscos e benefícios. Consequente a isso, a medicina complementar e alternativa procura por fontes naturais ricas principalmente em fitoestrógenos, compostos que mimetizam ou modulam a ação estrogênica.

Os fitoterápicos possuem diversos tipos de componentes, dentre eles, os chamados fitoestrógenos, que representam um grupo diversificado de substâncias químicas naturais semelhantes ao 17- $\beta$ -estradiol (E2), o principal hormônio sexual feminino. Esta similaridade estrutural permite ação estrogênica possivelmente devido à ligação ao receptor para estrógeno. Existem três principais tipos de fitoestrógenos, que são: isoflavonas, lignanas e cumestanas.

As isoflavonas, principais fitoestrógenos estudados, são encontradas principalmente na soja, e dentre elas, genisteína e daidzeína são as que possuem maiores propriedades estrogênicas. As lignanas podem ser encontradas em grãos, principalmente nas sementes de linhaça, frutas e vegetais. As cumestanas são encontradas nas sementes e brotos de alfafa. Além da soja e da linhaça, plantas como *Cimicífuga racemosa* e amoreira-preta (*Morus nigra*) têm sido alvo de diversos estudos quanto ao uso como fonte de bioativos e finalidade de reposição hormonal (AMER et al., 2011; MACKAY; EDEN, 1998). Assim, sugere-se que haja possível modulação estrogênica provindos de extratos como linhaça e amoreira sobre diversos sistemas do organismo. Com isso, o presente trabalho teve como objetivo verificar os efeitos estrogênicos da suplementação com extratos de linhaça e/ou amoreira sobre o sistema reprodutor, comportamental, metabólico e ósseo de animais ovariectomizados.



## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fisiologia endócrina do sistema reprodutor feminino

O sistema reprodutor feminino tem como principais funções, a produção hormonal, desenvolvimento folicular (gametogênese) e o processo ovulatório, os quais dependem da liberação coordenada de hormônios sexuais e de diversos fatores excitatórios, inibitórios e moduladores, tanto centrais e quanto periféricos (HILL et al., 2004). Os ovários são responsáveis pelo desenvolvimento dos folículos, que contém os gametas, para posterior ovulação, bem como pela produção de hormônios sexuais que agem tanto no trato reprodutivo como em outros sistemas não diretamente relacionados à reprodução. A secreção destes hormônios, por sua vez, está sob controle das gonadotrofinas adeno-hipofisárias, as quais são controladas pelo hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) hipotalâmico (AIRES, 2018).

O GnRH é o principal controlador do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HPG) e estimula à síntese e secreção de gonadotrofinas: hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) (DUDAS; MERCHENTHALER 2006; FINK 1986; GALLO 1981; HERBISON 1998). As gonadotrofinas agem nos ovários e promovem síntese e secreção principalmente de estrógeno e progesterona. O estrógeno é o principal fator periférico para o controle da síntese e secreção de GnRH e tem ação, principalmente, via interneurônios, como por exemplo, neurônios produtores de óxido nítrico, kisspeptina, leptina, dentre outros (DEL BIANCO BORGES et al. 2010; KEEN-RHINEHART et al. 2004; NAVARRO; TENA-SEMPERE, 2011; YU et al. 1997).

Os principais hormônios estrogênicos são:  $17\beta$ -estradiol, estrona e estriol, sendo que o primeiro possui maior ação estrogênica, e é secretado pelo ovário e em pequena quantidade pela adrenal. A estrona, embora secretada em pequenas quantidades pelo ovário, origina-se da conversão de androgênicos em tecidos periféricos e possui 1/12 da potência do estradiol. No fígado, ambos (estradiol e estrona) podem ser convertidos em um estrogênio mais fraco, o estriol, que apresenta 1/80 da potência do estradiol (AIRES, 2018).

Os estrógenos são hormônios esteroides (ZINGUE et al. 2013), com ação via dois tipos de receptores para estrogênio conhecidos como: alfa (ER- $\alpha$ ) e beta (ER- $\beta$ ). Estes receptores pertencem à família dos receptores nucleares, mas também observados em membrana plasmática, e sua principal função é a regulação da expressão de genes

envolvidos na diferenciação e desenvolvimento sexual (MOREIRA et al. 2014). Assim, a ligação destes hormônios a cada um destes receptores é responsável pela indução de diferentes respostas biológicas (SHUGHRUE et al., 1997).

A ligação com receptores nucleares provavelmente possibilita à ação ativadora/inibitória genética bastante diversificada denominada “nuclear ligand-activated transcription factors”, já a ação estrogênica sobre receptores de membrana, por sua vez, tem um papel importante na síntese, liberação e metabolismo de neurotransmissores, como a noradrenalina, a dopamina, a serotonina e a acetilcolina (STAHL, 2001). Os estrógenos também possuem ação da monamina oxidase (MAO) inibitória em várias regiões cerebrais e no qual promovem liberação de triptofano e proteínas ligantes plasmáticas, facilitando sua conversão para serotonina (YAFFE et al., 1998; SOARES et al., 2002).

## **2.2 Ação estrogênica no organismo**

Os estrógenos possuem várias ações no organismo, como promover a manutenção e desenvolvimento do sistema reprodutor feminino e das características sexuais secundárias, como no desenvolvimento das mamas, deposição de tecido adiposo proporcionais no corpo feminino e alterações no trato genital feminino, como no epitélio vaginal e parede uterina. Além disso, este hormônio também atua na modulação óssea, metabolismo, comportamental (com efeitos ansiolíticos e antidepressivos), dentre outros (MOREIRA et al. 2014).

O endométrio, camada mais interna do útero, é composto por duas camadas: 1) camada basal (contato com miométrio) e 2) camada funcional, que reveste internamente o útero e apresenta grande influência da ação estrogênica. No início da fase folicular ovariana, as quantidades crescentes de estrogênio aumentam a síntese proteica e também a proliferação das células do estroma e da camada epitelial. Também sob ação estrogênica, há desenvolvimento de glândulas endometriais e novos vasos sanguíneos, e promovem crescimento adicional da camada funcional do endométrio (ZELEZNIK, 2001).

Os estrógenos agem sobre o sistema cardiovascular, pois os receptores para estrógenos são expressos nas células endoteliais e sua ação induz o aumento de óxido nítrico, o que promove vasodilatação. Foi demonstrado por Hernandez e colaboradores, que a administração de  $17\beta$ -estradiol reduziu a pressão arterial e aumentou a permeabilidade vascular em ratas ovariectomizadas (HERNANDEZ et al., 2000), tais efeitos foram relacionados à maior produção de NO e/ou redução do estresse oxidativo, os quais

induziriam melhora da função endotelial (BOKOV et al., 2009).

Além disso, os estrógenos causam alterações no metabolismo lipídico, onde atua na redução do acúmulo de triacilgliceróis (TAG) e possui efeito na diminuição expressão da lipase lipoproteica (LPL), enzima que catalisa a conversão de triacilglicerol em ácidos graxos e glicerol (HOMMA et al., 2000). No fígado, o estrógeno regula a síntese de apolipoproteínas para lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL), reduz a síntese de apolipoproteína B (apo B100), enquanto estimula à síntese de apolipoproteínas (apoA1 e apoA2), componentes críticos na formação de HDL (MILLÁN et al., 2009). Já no hepatócito, o estrógeno estimula a síntese de apolipoproteína C3 (apo CIII), encontrada em lipoproteínas ricas em triacilgliceróis, enquanto diminui a síntese de lipase hepática. Portanto, o estradiol atua na regulação do metabolismo lipídico, tanto nos adipócitos quanto nos hepatócitos, no qual modula a concentração de lipídeos no plasma. Um dos mecanismos cardioprotetores do estrógeno é o aumento da síntese de HDL e degradação de lipoproteína de baixa densidade (LDL), justificando assim um balanço benéfico no metabolismo dessas lipoproteínas (MENDELSON e KARAS, 1999a). No entanto, frequentemente, mulheres no período de pós-menopausa apresentam alterações no perfil lipídico, apresentando assim, um de seus efeitos desfavoráveis, onde há evidência de um metabolismo mais aterogênico e maior risco de doenças cardiovasculares (TIKKANEN et al., 2002).

A manutenção da saúde óssea também é dependente da ação estrogênica, na qual promove regulação na formação óssea, pois aumenta a diferenciação dos osteoblastos, estimula a síntese e a mineralização da matriz óssea e também a maturação dos condrócitos. No período da puberdade, este atua nas cartilagens epifisárias dos ossos longos, no qual acelera o crescimento linear, e posteriormente, promove o fechamento dessas cartilagens (AIRES, 2018).

Os estrógenos são responsáveis por ações neuroprotetoras, neurotróficas, proteção contra o estresse oxidativo, e contra o dano causado pela proteína  $\beta$ -amilóide; também estimula à produção de fatores de crescimento neural, aumenta a concentração e número de receptores para neurotransmissores como: serotonina, dopamina e norepinefrina, além de melhorar a perfusão cerebral (efeito vasodilatador similar ao que ocorre nas artérias coronárias) e de exercer importante ação anti-inflamatória (SHEPHERD, 2001). Também

promove alterações na plasticidade sináptica, aumentando a densidade de espículas dendríticas e sinapses em neurônios presentes, por exemplo, no hipocampo (BLAND, 2000; BRANDT et al., 2013; CLAPAUCH et al., 2002; KATO et al., 2013).

A maioria dos estudos da função reprodutiva de fêmeas é realizada em ratas, pelo fato destes animais possuírem um perfil de ciclo reprodutivo muito semelhante ao das mulheres, embora sejam observadas algumas diferenças. Assim, uma boa metodologia para verificar a ação estrogênica no dia a dia de animais de laboratório é através da observação de células vaginais, e com isso verificar o ciclo estral destes animais.

### **2.2.1 Ciclo Estral e Lavado Vaginal**

A determinação do ciclo estral em animais é importante para estudos do eixo reprodutivo e pode ser monitorado facilmente e de maneira não invasiva, observando-se as mudanças diárias na citologia vaginal. O conhecimento do ciclo estral permite avaliação da atividade ovariana, já que esta muda abruptamente e reflete às flutuações das concentrações de estrógenos, como também qualquer alteração que leve à disrupção desse padrão por agentes ambientais ou tóxicos. Didaticamente, o ciclo estral das ratas pode ser dividido em quatro fases: diestro I (metaestro), diestro II, proestro, estro (MARCONDES et al., 2002). A fase de proestro caracteriza-se pelos eventos hormonais que promovem a ovulação, ou seja, fase em que há alta ação estrogênica.

O início da puberdade é marcado pela abertura vaginal e ocorrência de esfregaço totalmente cornificado, característico da fase de estro, que sinaliza ter acontecido a primeira ovulação.

### **2.3 Menopausa e redução da circulação estrogênica**

A partir da quarta ou quinta década de vida, os ovários começam a entrar em falência e há diminuição na concentração plasmática de estrógeno, levando à síndrome climatérica, a qual corresponde ao período de transição gradual da fase reprodutiva para a não reprodutiva, menopausa (ALVARADO-GARCÍA et al., 2015).

Entretanto, alguns autores consideram que o início desta fase seja a partir dos 40 anos de idade da mulher, época em que se identificam as primeiras alterações endócrinas, advindas não só da alteração do desenvolvimento folicular ovariano, mas também da dessincronização dos sinais neuronais tanto hipotalâmicos, quanto extra-hipotalâmico (MATT et al., 1998; WISE et al., 1999). Estas alterações promovem diminuição na

concentração de estrógeno plasmático, que leva a alterações dos ciclos menstruais e aparecimento de fogachos, dentre outros fatores, o que caracteriza a menopausa.

Assim, a menopausa é o período que marca o fim permanente da atividade menstrual, com redução da secreção estrogênica. Por sua vez, a escassez deste hormônio acarreta em mudanças desconfortáveis no metabolismo feminino tais como: ondas de calor, alterações do perfil lipídico, acúmulo de gordura central, osteoporose, complicações cardiovasculares, alterações na memória, distúrbios do sono, depressão, ansiedade, dentre outros (DJERASSI, 1992). Além disso, sintomas relacionados ao trato reprodutor também são observados, como atrofia e diminuição da lubrificação vaginal (STURDEE; PANAY, 2011).

Os tecidos urogenitais são extremamente sensíveis ao estrogênio, e as suas flutuações, que ocorrem durante a transição da menopausa. Com a diminuição estrogênica, ocorrem alterações na estrutura e função dos tecidos genitais, contribuindo, para perda de elasticidade da mucosa, indução da fusão e hialinização de fibras colágenas, e a fragmentação de fibras de elastina. A diminuição na hidratação da mucosa vaginal na camada dérmica, também é afetada, com redução de mucopolissacarídeos e ácido hialurônico intercelular, o que gera um epitélio estratificado fino com apenas as camadas basal e parabasal (LEVINE et al., 2008; SALVATORE et al., 2015). Múltiplos estudos populacionais e comunitários confirmam que cerca de 27% a 60% das mulheres relatam sintomas moderados a graves de diminuição de lubrificação vaginal ou dispareunia em associação com a menopausa (SANTORO; KOMI, 2009). Atrofia vaginal e uterina, além de prolapso, também pode ocorrer, levando às altas taxas de dispareunia. Além disso, o estrógeno tem grande ação na uretra e bexiga, e à medida que a redução de estrógeno se torna evidente, os pacientes podem desencadear recorrentes infecções urinárias (SANTORO et al., 2015).

Alterações do controle da temperatura corporal também são verificadas com a diminuição da ação estrogênica. Sintomas vasomotores também afligem a maioria das mulheres durante a transição da menopausa, embora sua gravidade, frequência e duração variem amplamente entre as mulheres. Os fogachos são relatados por até 85% das mulheres na menopausa (BROMBERGER et al., 2007), e estão presentes em até 55% das mulheres, antes mesmo do início da irregularidade menstrual (REED et al., 2014). Sua incidência e gravidade aumentam à medida que as mulheres atravessam a menopausa, atingindo o pico ao

fim da menopausa e vai diminuindo com o decorrer dos anos (SANTORO et al., 2015).

Há evidências de que a perimenopausa (climatério) representa outro período de vulnerabilidade de depressão para as mulheres. Mulheres sem episódio anterior de depressão são 2 a 4 vezes mais propensas a viver um episódio depressivo durante a transição da menopausa em comparação com mulheres na pré-menopausa que também não apresentaram episódios anteriores. Os sintomas de ansiedade precedem à depressão em alguns casos, e a ansiedade também pode ser vista como um fator que aumenta a vulnerabilidade da mulher a um episódio depressivo da meia-idade (KRAVITZ et al., 2014). Estes fatos são evidenciados pelas alterações hormonais que ocorrem durante a menopausa levando ao aumento do risco de depressão associado à variabilidade das concentrações estrogênicas (SANTORO et al., 2015).

O aumento do risco de doenças cardiovasculares (DCV), é um fator comum também observado nas mulheres na menopausa, devido à redução da circulação estrogênica. O Study of Women's Health Across the Nation (SWAN) relatou que as concentrações plasmáticas de lipídeos, como colesterol total (CT), LDL, TAG e apolipoproteína B (Apo B) estavam elevados no período de 1 ano antes e após o último período menstrual, parâmetros estes, associados à alterações induzidas pela menopausa (DERBY et al., 2009; KAYA et al., 2017). Estudos anteriores demonstraram que as concentrações de CT, LDL, TAG e Apo B são maiores em mulheres na pós-menopausa do que na pré-menopausa (CHANG et al., 2000). Choi e colaboradores sugeriram que alterações anormais no perfil lipídico ocorrem principalmente em mulheres na menopausa tardia (CHOI et al., 2015).

A osteoporose na pós-menopausa é de particular importância, devido às consequências potencialmente danosas à saúde. A osteoporose é uma doença crônica, definida como um distúrbio esquelético, caracterizado pela diminuição da resistência óssea, que predispõe os indivíduos afetados à fraturas. A deficiência estrogênica devido à redução da atividade e falência ovariana, durante o climatério e a menopausa propriamente dita, altera a modulação sob a proteção óssea, levando o aumento da perda óssea, sendo no início de osso trabecular e depois também de osso cortical. Sendo que, tratamentos relativamente simples podem mudar a história natural da doença (BACCARO et al., 2015; MARINHO et al., 2014).

Outras modificações ocorridas no período da menopausa são as mudanças

morfológicas que ocorrem no fígado à medida que as mulheres se tornam mais idosas. Tais mudanças incluem reduções no fluxo e volume sanguíneo hepático, bem como, alterações na capacidade de regeneração do fígado. Dados mostraram que o volume, função e fluxo sanguíneo diminuem aproximadamente 1% ao ano após os 40 a 50 anos de idade (BRADY, 2015). Em geral, o volume do fígado diminui em 20% a 40% em pessoas com idade avançada, e essa redução é notada como sendo mais marcante nas mulheres, principalmente no período menopáusic. Já o fluxo sanguíneo é reduzido em 35% a 50% nos idosos e pode contribuir para a redução do volume hepático observado com o aumento da idade (TAJIRI; SHIMIZU, 2013).

Com o reconhecimento de que a falta da ação estrogênica na menopausa leva a numerosos efeitos deletérios para o organismo feminino, o desenvolvimento da terapia hormonal sintética pela indústria farmacêutica tornando-se a primeira opção de escolha.

### **2.5 Hormônios sintéticos**

A terapia de reposição hormonal sintética tornou-se a primeira opção de escolha para muitas mulheres que buscavam minimizar os desconfortos causados no período menopáusic. Entretanto, há diversas discussões e restrições sobre o emprego dos mesmos, especialmente em mulheres com histórico familiar de câncer de mama e útero (DJERASSI, 1992; LÓRÁND; VIGH; GARAI, 2010).

O Instituto de Saúde dos Estados Unidos realizou um estudo denominado ‘*Women’s Health Initiative (WHI)*’ do tipo caso-controle randomizado, no qual avaliou 16 mil mulheres divididas em dois grupos: um grupo fez o uso de terapia de reposição hormonal e outro de placebo. O uso da terapêutica com hormônio estrogênico conjugado equino (ECE/ 0,625 mg) e acetato de medroxiprogesterona (AMP/ 2,5 mg), utilizada de forma ininterrupta em mulheres após a menopausa (média de idade de 63,2 anos), demonstrou que houve aumento no número de casos de câncer de mama, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral (AVC) e ocorrências de formação de trombos sanguíneos, que podem levar, por exemplo, à embolia pulmonar. Por outro lado, houve redução nos casos de câncer de cólon e fraturas no osso do quadril (GRADY et al., 1998; ROSSOUW; ANDERSON, 2002). Outro estudo teve como meta, verificar se o uso de estrógenos exógenos (estradiol) exerceria um efeito cardioprotetor nas mulheres após a menopausa, porém, os resultados obtidos foram contrários a esta expectativa (SCHERNHAMMER et al., 2004).

Assim, a segurança para o emprego da terapia com hormônios sintéticos é alvo de questionamentos, tanto por pacientes quanto por clínicos. Isso faz com que a medicina complementar e alternativa procure por fontes naturais, como por exemplo, fitoterápicos, ricos em fitoestrógenos, sendo esta uma tendência cada vez mais comum na sociedade contemporânea (MCMILLAN; MARK, 2004).

## **2.6 Fitoterápicos**

O uso de plantas medicinais na terapêutica humana é uma prática que atravessa séculos. Na sociedade contemporânea verificou-se uma intensificação desta prática e há um nítido crescimento no uso de produtos naturais no tratamento de diversas patologias (SHALE et al., 2005), em especial, a busca por alternativas ‘naturais’ para terapias de reposição hormonal.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 65% da população mundial, principalmente nas nações em desenvolvimento, recorrem às plantas medicinais como opção para o tratamento de suas doenças. Os produtos destas plantas são empregados para diversos fins, geralmente associados a outros medicamentos (alopáticos, homeopáticos) fundamentados em evidências históricas ou pessoais, sem ênfase para a possibilidade ou não de efeitos adversos (FUNARI; FERRO, 2005; SILVEIRA et al., 2008).

Os fitoterápicos são medicamentos feitos exclusivamente a partir de plantas, tal como está na natureza, sem agregar nenhuma substância isolada, farmacologicamente ativa, mesmo que seja de origem vegetal. São usados para o tratamento de doenças e sintomas, isto é, têm efeito terapêutico. Alguns medicamentos são produzidos utilizando o princípio ativo extraído de uma planta, dando origem aos fitofármacos (FIGUEREDO, 2007).

As plantas utilizadas na produção de um fitoterápico pode ser utilizada como alimento ou não. A partir destas conceituações, podemos ter plantas que se enquadram como alimento funcional, nutracêutico e fitoterápico. Como exemplo, temos o tomateiro, que é um alimento funcional, onde seu fruto está na forma de alimento comum, é consumido como parte da dieta, e por possuir vitaminas e sais minerais. Também é um nutracêutico, que são alimentos ou parte dos alimentos que apresentam benefícios à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças, e o fato do tomateiro conter licopeno, previne o câncer de próstata. Por fim, o tomateiro também é um fitoterápico, pois em sua composição, há o princípio ativo chamado tomatina que é eficaz no tratamento da candidíase (ALONSO, 2004).



A linhaça é uma potente fonte de fibras alimentares, ácidos graxos, mucilagens e lignanas, que são responsáveis pelos seus efeitos medicinais. Mas também possuem glicosídeos linimarina, que são glicosídeos cianogenéticos, tóxicos para o organismo em grande quantidade (SCHULZ; HÄNSEL; TYLER, 2001). O tratamento fitoterápico a partir da linhaça, é uma excelente forma de tratar doenças, como constipação e obesidade, pois seus efeitos são próximos aos efeitos fisiológicos e, na maioria das vezes, não trazem malefícios à saúde, além de ter baixo custo à população (SCHRÖEDER; SANTOS, 2012).

A espécie medicinal *Morus nigra* (amoreira) vem sendo muito utilizada pela população como fitoterápico, mas ainda não apresenta muitos estudos para que possa ser empregado de maneira racional. Sendo assim, estudos que forneçam parâmetros de qualidade e segurança, bem como, ensaios biológicos e farmacológicos, são fundamentais para que se possa dar crédito ao uso de plantas medicinais (PADILHA, 2009).

Tanto a linhaça quanto a amoreira, são produtos que contem grandes quantidades de fitoestrógenos e podem auxiliar na redução de sintomas causados pela redução da função ou falência ovariana.

## **2.7 Fitoestrógenos**

Os fitoterápicos possuem vários tipos de componentes, dentre eles, os fitoestrógenos, que constituem um grupo de compostos não esteroides, encontrados em diversos vegetais e são conhecidos por induzirem respostas biológicas e por mimetizar ou modular a ação estrogênica, se ligando aos receptores para estrógeno. Grande parte desses compostos apresentam um anel fenólico em sua estrutura, responsável pela capacidade de ligação aos receptores hormonais, podendo agir como agonistas ou antagonistas estrogênicos, dependendo do sítio de atuação (GLAZIER; BOWMAM, 2001; NAFTOLIN; GUADALUPE STAMBURY, 2001; POLUZZI, 2014). Os fitoestrógenos são encontrados nas plantas e nos alimentos na forma de conjugados glicosídicos, já nos alimentos fermentados estão desconjugados como agliconas (FARMAKALIDIS; MURPHY, 1985, WANG et al., 2002).

Após serem metabolizados por bactérias da microbiota intestinal, são absorvidos e vão para circulação sanguínea, tendo a capacidade de atingirem diversos tecidos, se ligarem a receptores estrogênicos e terem propriedades tanto estrogênicas quanto antiestrogênicas, sendo as principais fontes de fitoestrógenos, as isoflavonas e lignanas (PADILHA;

PINHEIRO, 2004). Sabe-se que grande parte dos fitoestrógenos oferecem benefícios relacionados aos sintomas da menopausa e à densidade óssea. Entretanto, ainda existem muitas contradições no que diz respeito às ações estrogênicas relacionadas aos fitoestrógenos, como na ação anticancerígena e cancerígena (CESAR et al., 2007).

Estudos sugerem que tais compostos exerçam efeito protetor no desenvolvimento de tumores. Há hipóteses de que a genisteína (isoflavona), por exemplo, pode ser protetora durante a fase de promoção do câncer. Essa ação protetora tem origem na observação de que mulheres asiáticas que consumiam soja como parte da dieta tiveram risco 3 a 5 vezes menor de câncer de mama do que mulheres caucasianas que não consumiam regularmente soja (FERLAY et al., 2004). No entanto, outros fatores relacionados ao estilo de vida, como grau de atividade física, podem ser importantes contribuintes para explicar as disparidades de incidência de câncer de mama em uma população (GANRY, 2002).

Porém, existem algumas evidências de que a genisteína e a daidzeína (isoflavonas) favoreçam a tumorigênese. Foi observado em um estudo que, a genisteína induziu a expressão de genes envolvidos na proliferação de células de câncer de mama em mulheres com câncer de mama dependente de estrogênio (SHIKE et al., 2014). Semelhantemente, as isoflavonas de soja demonstraram aumentar a densidade mamária em mulheres pós-menopáusicas ocidentais (ISIDORO et al., 2016).

Os fitoestrógenos são classificados em três principais grupos: isoflavonas, coumestanos e lignanas.

### **2.7.1 Isoflavonas**

As isoflavonas incluem genisteína, daidzeína, glicetina, formononetina e biochantina A, encontrados em alimentos à base de soja e leguminosas, geralmente na forma conjugada. A diferença existente entre a genisteína e a daidzeína se deve apenas à presença do grupo 5-hidroxila da genisteína. A soja é a maior fonte de genisteína e daidzeína, e uma de suas formas químicas é o composto b-D-glicosídicos biologicamente inativo, porém, após a ingestão, são hidrolisados por bactérias  $\beta$ -glucosidases presentes na mucosa intestinal, obtendo assim sua forma bioativa, aglicósidos, que mais uma vez hidrolisadas, transformam-se em agliconas que podem ser absorvidas pelo intestino delgado por difusão passiva (KING et al., 1996).

As isoflavonas, encontradas principalmente na soja, são substâncias pertencentes ao

grupo dos polifenóis, subgrupo dos flavonóides, também encontrados em outros produtos como: vegetais, nozes, frutas, óleo de oliva e bebidas derivadas como café, chá, vinho tinto, e em muitas ervas medicinais (HOLLMAN; KATAN, 1997).

### **2.7.2 Coumestanos**

Embora haja um grande número de coumestanos, apenas uma pequena quantidade apresenta atividade estrogênica, predominantemente o coumestrol e methoxycoumestrol (NDEBELE et al., 2010). Os alimentos ricos em coumestanos incluem ervilhas, feijões e brotos de alfafa (LAMPE, 2003). Em um estudo de Whitten e colaboradores, o coumestrol mostrou ter efeitos tanto estrogênicos quanto antiestrogênicos na fisiologia reprodutiva (WHITTEN et al., 1995).

### **2.7.3 Lignananas**

As lignanas apresentam a principal fonte de fitoestrógenos na dieta ocidental (de KLEIJN et al., 2002; VALSTA et al., 2003). Grãos oleosos, como a linhaça, contêm as maiores concentrações de lignanas biologicamente ativas (CORDEIRO et al., 2009).

## **2.8 Linhaça (*Linum usitatissimum*)**

Linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é um alimento funcional que tem atraído o interesse crescente de pesquisadores, pois contém componentes biologicamente ativos, como fibras alimentares, proteínas vegetais, ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) e lignanas, que desempenham um papel benéfico no organismo, possibilitando a prevenção de doenças (KAJLA et al., 2015). Ela é a fonte mais rica de lignanas na dieta humana (POLUZZI, 2014). Sua composição média é de 41% de lipídeos, 20% de proteínas, 28% de fibra total, 7,7% de umidade, 3,5% de cinzas e 1% a 2% de açúcares simples, além de ser uma fonte importante de compostos fenólicos e vitaminas A, D, E e K (KASOTE, 2013; MORRIS, 2007; NOVELLO; POLLONIO, 2011).

A linhaça é proveniente de uma planta herbácea, que pertence à família *Linaceae*, nativa da Europa, Ásia e Região Mediterrânea. É considerado um alimento funcional e a variedade mais comum é a semente de cor marrom escura brilhante, tendo também a dourada. A cor das sementes é determinada pela quantidade de pigmentos e estes podem ser alterados por práticas de reprodução da planta. Porém, possuem quantidades semelhantes de nutrientes, diferindo apenas no teor de fibra total, que é maior na variedade marrom e na quantidade de proteínas que é maior na variedade dourada (GANORKAR; JAIN, 2013). A

semente de linhaça é usada como matéria-prima para a produção de óleo e farelo, sendo rica em fibras, proteínas e gorduras (NESBITT et al., 1997).

A semente de linhaça é rica em lignanas, fitoestrógenos comumente consumidos na dieta humana, e o diglucosídeo secoisolariciresinol (SDG) é a principal lignana encontrada (aproximadamente 1% em peso seco) (KHALESI et al., 2011). Após seu metabolismo no intestino e no cólon, o SDG é metabolizado em 3 moléculas: secoisolariciesinol (SECO), enterodiol (ED) e enterolactona (EL), as quais têm demonstrado efeitos benéficos para a saúde (HU et al., 2007; ZHANG et al., 2008).

O óleo de linhaça é rico em ácido alfa-linolênico (ALA), contendo aproximadamente 57% de ALA. Foi demonstrado em estudos anteriores que o ácido eicosapentaenóico e o ácido docosahexaenóico, que são formados a partir do metabolismo do ALA, reduzem o risco de doenças crônicas, como aterosclerose, doenças cardiovasculares, câncer e hiperlipidemia (RODRIGUEZ; LEYVA et al., 2010).

O SECO é o principal precursor de lignana da linhaça, sendo convertido por bactérias do cólon para enterodiol e enterolactona, estes se assemelham estruturalmente ao estrogênio, e por isso possuem potencial para agir como agonistas e/ou antagonistas em tecidos sensíveis a este hormônio (AYERS, LOIKE, 1990; SACCO et al., 2009). Devido a esta propriedade, a linhaça tem sido indicada para o tratamento da síndrome do climatério. Existem alguns estudos que tem demonstrado o uso da linhaça como auxiliar na terapia de reposição hormonal, sem apresentar os efeitos adversos gerados pela terapia de reposição hormonal convencional (DESPAIGNE, 2001).

### **2.9 Amoreira (*Morus nigra*)**

Uma planta medicinal bastante utilizada na medicina popular é a *Morus nigra* que produz o fruto amora. Essa espécie pertence ao gênero *Morus* e à família *Moraceae*. É conhecida popularmente como amoreira-preta, com origem no continente Asiático, e é perfeitamente cultivável no clima brasileiro (MOREIRA et al., 2010). O gênero *Morus* é conhecido por conter variedade de compostos fenólicos, incluindo flavonoides isoprenilados, cumarinas, cromonas, xantonas e fitoalexinas. Esta planta possui grande valor nutricional e sabor característico de seus frutos, além conter em sua composição, vários princípios ativos com ação terapêutica, como por exemplo atividade antioxidante, antinociceptiva, hipoglicemiante, anti-inflamatória, entre outras. Os frutos, cascas, raízes e folhas, são

largamente utilizados na medicina popular (FRANZOTTI, 2006).

As folhas da amoreira são usadas tradicionalmente para fins terapêuticos, como tratamento de diabetes, hipercolesterolemia, menopausa e obesidade (OLIVEIRA et al. 2013). Ácidos cafeico, clorogênico e gálico, e flavonóides quercetina e rutina, foram encontrados em extratos de folhas de *Morus nigra* (FREITAS et al. 2016). Os compostos fenólicos presentes no fruto de *Morus nigra* e de outras espécies apresentam amplo espectro de atividade bioquímica, tais como propriedades antioxidantes, antimutagênicas e anticarcinogênicas, bem como capacidade moduladora da expressão gênica (NAKAMURA et al., 2003). Naderi e colaboradores demonstraram que o extrato dos frutos de *Morus nigra* possui ação protetora contra o dano peroxidativo de biomembranas e biomoléculas (NADERI et al., 2004). Dois novos flavonoides prenilados foram isolados das cascas do caule dessa espécie, sendo eles, momigrol E e momigrol F (WANG et al., 2009), bem como ácido betulínico, â-sitosterol e germanicol (PADILHA et al., 2010). Além disso, estudos recentes revelaram que o chá da folha de *Morus nigra* teve efeitos benéficos ao ser utilizado no tratamento de alguns transtornos da menopausa e até mesmo como terapia de reposição hormonal (PADILHA, 2009).

Estudos de cromatografia gasosa verificou que o extrato metanólico de folhas de *Morus nigra* teve características semelhantes à isoflavona, e que estas moléculas possuíam características semelhantes ao 17 $\beta$ -estradiol (BOLZAN, 2008). Outros estudos sugerem uma possível existência de componente semelhante ao estradiol, podendo conter estrona nas folhas da amoreira ou outro componente que estimularia à produção endógena deste hormônio (VANONI, 2006).

Diversas espécies de *Morus* têm sido utilizadas na medicina popular como hepatoprotetora, hipotensora, antipirético, analgésico, diurético, antidiabético (JÚNIOR et al., 2017). Além disso, estudos demonstraram que *Morus nigra* não apresenta efeito toxicológico (OLIVEIRA et al., 2013) e apresenta propriedades farmacológicas com tratamento a longo prazo, como o hipoglicêmico em ratos normais (ALMEIDA et al., 2011). Essas ações foram relatadas pela presença de flavonóides, que possuem poderosos antioxidantes associados às suas propriedades medicinais, incluindo a atividade antidiabética (JÚNIOR et al., 2017).

Produtos como linhaça e amoreira possuem considerável quantidade de compostos

fenólicos, e estes podem exercer efeitos preventivos e/ou curativos em distúrbios fisiológicos, devido à sua ação antioxidante não enzimática.

### **2.10 Fenólicos Totais**

Os compostos fenólicos ou polifenóis, são definidos quimicamente como substâncias que apresentam um anel aromático unido a um ou mais grupos hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais que os confere o poder antioxidante. Pode encontrar no reino vegetal cerca de cinco mil fenóis, sendo os mais prevalentes os flavonoides (antocianinas, flavonóis e seus derivados), ácidos fenólicos (ácido benzoico, cinâmico e seus derivados), cumarinas, fenóis simples, taninos, ligninas e tocoferóis (JIMÉNEZ, 2010). A partir do metabolismo secundário das plantas, tem-se a formação dos compostos fenólicos, sendo essenciais para crescimento e reprodução das mesmas (SARTORI, 2012).

Os compostos fenólicos, presente nas plantas, tem sido alvo de muitos estudos, por apresentarem elevada capacidade antioxidante, atividades farmacológicas e também por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos (HOLLMAN; KATAN, 1998; SOARES, 2002). Em alimentos, os fenólicos podem contribuir para o amargor, adstringência, cor, *flavor*, odor e estabilidade oxidativa (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

A extração e a purificação de antioxidantes a partir de fontes naturais têm se tornado essencial para a utilização dessas substâncias na preparação de alimentos funcionais, e como aditivos para produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios, com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos, uma vez que, aumentam a vida útil de muitos produtos em 15 a 200%. Tal efeito decorre de suas propriedades, que retardam reações de oxidação em alimentos, e há perspectivas de que antioxidantes provindos de alimentos possam ser usados futuramente no tratamento de doenças cuja gênese envolva processos oxidativos (LOPES et al., 2000).

### **2.11 Atividade Antioxidante**

O termo oxidação de uma substância refere-se à conversão de uma substância química em um derivado com menor número de elétrons. Oxidação, portanto, é a perda de um ou mais elétrons para outra substância e o procedimento inverso pode ser considerado como redução (LARSON, 1997). A transferência de elétrons é um dos processos químicos mais fundamentais para a sobrevivência das células. O efeito colateral dessa dependência é a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem levar ao dano

oxidativo. Radicais livres são átomos ou moléculas produzidos continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes ao metabolismo (BAE et al., 1999).

Os radicais livres possuem diferentes papéis no organismo, e estão envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, seu excesso apresenta efeitos deletérios para o organismo (HALLIWELL et al., 1992).

Para combater os radicais livres, existem os antioxidantes, que são capazes de estabilizar os mesmos. O organismo dispõe de antioxidantes endógenos que produzem substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos. Além destes, substâncias com habilidade de sequestrar radicais livres podem ser obtidas de fontes externas, como alimentos e bebidas. Estudos sobre radicais livres e o desenvolvimento de novos métodos para avaliação de atividade antioxidante (AA) têm aumentado consideravelmente (ALVES et al., 2010). Como descrito acima, há evidências que tanto a linhaça como a amoreira podem exercer efeitos antioxidantes e com isso melhorar ou prevenir diversas alterações fisiológicas. Existem diversos métodos para determinar atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas, como por exemplo pela captura do radical livre DPPH ou pela autoxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoleico.

### **2.11.1 Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH**

Um dos métodos mais utilizados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH, de coloração púrpura que absorve a 515 nm (ROGINSKY; LISSI, 2005). O método baseia-se na transferência de elétrons, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar ( $R\bullet$ ), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (abs). A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMS ET AL., 1995; SÁNCHEZ-MORENO ET AL., 1998).

### **2.11.2 Autoxidação do sistema beta-caroteno/ácido linoleico**

O sistema beta-caroteno/ácido linoleico foi desenvolvido por Marco (1968),

modificado por Miller (1971) e consiste na utilização do ácido linoleico, o monopalmitato de polioxietileno sorbitan (Tween 40) e o beta-caroteno. O ácido linoleico em presença de oxigênio forma o radical peroxil (LOO•), este radical reage com o beta-caroteno, resultando na perda da coloração da solução passando da cor amarelo intenso para amarelo claro. A adição de uma amostra que contenha antioxidantes pode reagir competitivamente com o radical peroxil, contribuindo para retardar a queda de absorbância do beta-caroteno. Portanto os antioxidantes presentes nas amostras podem ser facilmente monitorados pelo branqueamento da cor da solução (JAYAPRAKASHA; PATIL, 2007).

Este método é amplamente utilizado, principalmente por não recorrer a altas temperaturas, permitindo a determinação do poder antioxidante de compostos termossensíveis e a avaliação qualitativa de extratos vegetais. Este ensaio apresenta algumas desvantagens como a dificuldade de interpretação dos dados devido à interação do beta-caroteno com oxigênio e a reprodutibilidade dos valores de absorbância (AMIN; NORAZAIDAH; HAINIDA, 2006). Este método tem sido muito utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais em modelos de atividade antioxidante com o objetivo de avaliar o grau de inibição da oxidação (ALVES et al., 2010).

Com base nos dados apresentados acima, é de conhecimento que a gestão dos sintomas da menopausa, é uma realidade comum à praticamente todas as mulheres e um determinante da qualidade de vida (KOMESAROFF et al, 2001). Com isso, faz-se necessário o entendimento dos efeitos de determinados alimentos, ricos em fitoestrógenos, para possibilitar a minimização dos efeitos causados pela menopausa e possibilitar uma melhor qualidade de vida para estas mulheres.

Assim, a hipótese deste trabalho é que a utilização de extratos de linhaça e/ou amoreira melhoram os sinais e sintomas relacionados à falência ou redução da função ovariana.



### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Verificar a ação da suplementação com extratos de linhaça e/ou amoreira sobre o sistema reprodutor, metabólico, ósseo, comportamental e na hipófise de animais ovariectomizados.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Quantificar o teor de fenólicos totais dos extratos utilizados;
- Avaliar a capacidade dos extratos utilizados de sequestrar radicais livres pelos ensaios de DPPH e  $\beta$ -caroteno/Ácido Linoleico;
- Verificar o ganho de peso dos animais ao longo do tratamento;
- Analisar efeito comportamental, como ansiedade e depressão, dos animais expostos ao teste do Labirinto em Cruz Elevado;
- Verificar células presentes no lavado vaginal dos animais ao final do tratamento;
- Verificar peso hipofisário dos animais ao final do tratamento;
- Analisar histomorfometricamente a parede uterina e o fêmur após o tratamento;
- Analisar histopatologicamente o fígado, com intuito de verificar possíveis malefícios do tratamento para o organismo dos animais;
- Avaliar concentrações plasmáticas de: colesterol total e frações, triacilgliceróis, lipase, ácido úrico, transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico-pirúvica (TGP).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Apreciação ética**

Este projeto foi aprovado (28/09/2017) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Lavras (UFLA), protocolo n° 013/17. (ANEXO 1)

### **4.2 Animais**

Foram utilizadas 32 ratas fêmeas Wistar adultas (*Rattus norvegicus*), pesando em média  $210g \pm 10$ , mantidas em fotoperíodo de 12/12 horas (luz das 07 - 19 horas), à temperatura de aproximadamente 22°C, com água e ração *ad libitum*. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com sete repetições para cada tratamento. Os animais ficaram ambientados por aproximadamente uma semana no Biotério Central Multiusuário da Universidade Federal de Lavras, antes do procedimento cirúrgico.

#### **4.2.1 Grupos experimentais**

Todos animais foram ovariectomizados e divididos em cinco grupos, sendo eles: a) tratados com salina (salina); b) tratados com estrógeno (estrógeno); c) tratados com extrato de linhaça (linhaça); d) tratados com extrato de amoreira (amora); e) tratados com extrato de linhaça e amoreira (composto).

### **4.3 Procedimento cirúrgico**

#### **4.3.1 Ovariectomia (OVX) bilateral**

Para a realização da ovariectomia bilateral, os animais foram anestesiados com Ketamina (90mg/kg – Ketamina, Sespo Indústria e Comércio Ltda) e Xilazina (10mg/kg, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda), receberam incisão bilateral, por onde os ovários foram retirados e após a ovariectomia, os animais foram suturados com fio de algodão preto Suturim 5mm da marca Biodinâmica. As ratas receberam dose profilática de Pentabiótico Veterinário (0,2ml/rata, Zoetis Indústria de Produtos Veterinários Ltda) e analgésico flunixinina (me glumina) (2,5mg/kg, Banamine, Chemitec Agro-Vetrinária Ltda). Após o procedimento cirúrgico, os animais permaneceram no biotério para a recuperação e metabolização do estrógeno endógeno remanescente por 15 (quinze) dias.

### **4.4 Obtenção e preparo das soluções administradas**

#### **4.4.1 Linhaça e amoreira**

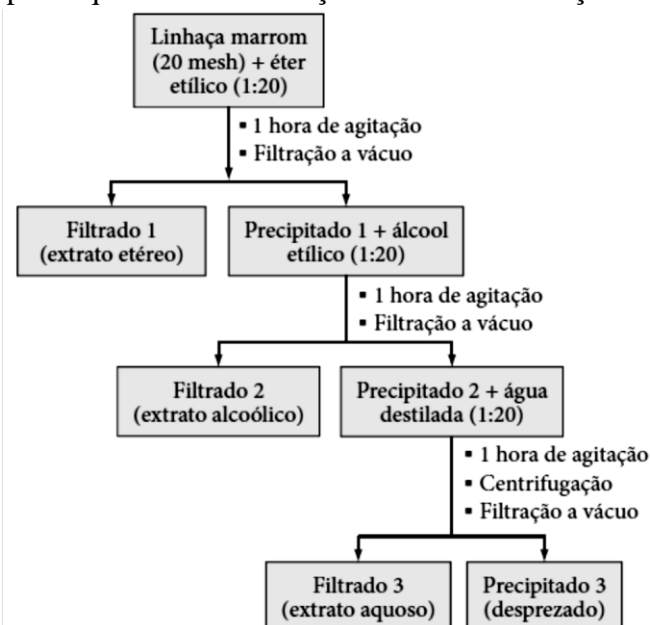
Os grãos de linhaça marrom e as folhas, caules e pecíolos da amoreira foram cedidos

pela empresa A Granel Emporium (CNPJ: 26394241/0001-56), em colaboração com a nutricionista Glenda Esther Bernades Simões. Os grãos da linhaça foram triturados em liquidificador da marca Philips Walita até obtenção da farinha, e as folhas, caules e pecíolos da amoreira foram processados em liquidificador da mesma marca, até obter pequenas frações. Ambos pesados, sendo 60 gramas de linhaça e 45 gramas das folhas, caules, pecíolos da amoreira, para posterior extração.

As soluções contendo os extratos de linhaça e de amoreira foram obtidas por meio de extração no Laboratório de Caracterização Físico-Química de Alimentos do Departamento de Nutrição da UFLA.

Através da metodologia de Galvão e colaboradores foi realizada a extração para obtenção do óleo da linhaça (GALVÃO et al., 2008) (FIGURA 1).

Figura 1 - Etapas sequenciais da extração do óleo de linhaça.



Fonte: GALVÃO et al. (2008).

Por meio da metodologia de Fu e colaboradores, as frações de folhas secas, caules e pecíolos da amoreira foram extraídos com etanol 95%, por 3 horas, em temperatura de 60-70°C, concentrados em um rotaevaporador à vácuo, da marca SOLAB (SL-126), para obtenção do extrato bruto e que posteriormente foi diluído em água destilada (FU et al., 2012). Após obtenção dos extratos, os mesmos foram envasados em frasco âmbar, protegidos com papel alumínio e armazenados sob temperatura de refrigeração à 4°C.

Para a administração do extrato de linhaça (SAWANT; BODHANKAR, 2016), a

partir do filtrado 3 obtido pelo método de extração como descrito na Figura 1 e da amoreira (DO et al., 2008), foram utilizadas as doses de 400 mg/kg para ambos extratos. Para o grupo composto (linhaça + amora) foi utilizada a dose de 200mg/kg de linhaça e 200 mg/kg de amoreira.

#### **4.4.2 Estrógeno**

O estrógeno (estriol, 1mg/comprimido – Ovestrion, Eurofama Laboratório S.A.) foi macerado, diluído em 500 ml de água destilada, envasado em frasco âmbar e armazenado sob temperatura de refrigeração à 4°C. O estrógeno foi administrado na dose de 0.158 mg/kg (ZHAO et al., 2011).

#### **4.5 Ensaio antioxidantes *in vitro***

Os extratos de linhaça e de amoreira foram submetidos a ensaios de determinação de atividade antioxidante no Laboratório de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciências dos Alimentos da UFLA.

##### **4.5.1 Determinação da Atividade Antioxidante Total pela captura do radical livre DPPH**

Em um balão volumétrico de 1.000 mL, foi adicionado 500 mL de álcool metílico e completado com água destilada, sendo homogeneizado e transferido para um frasco de vidro. Já em outro balão volumétrico de 1.000 mL adicionou-se 700 mL de acetona e completado o volume com água destilada, que também foi homogeneizado e transferido para um frasco de vidro. 40 mL da solução de álcool metílico 50%, 40 mL da solução de acetona 70% e mais 100 mL de água destilada foram colocados em um balão volumétrico, homogeneizados e transferidos para um frasco de vidro. O DPPH na concentração de 2,4 mg foi dissolvido em álcool metílico.

Em um ambiente escuro, foi realizada curva do DPPH, utilizando uma solução inicial de DPPH (60 µM), assim uma alíquota de aproximadamente 4 mL foi transferida de cada solução de DPPH (10 µM, 20 µM, 30 µM, 40 µM, 50 µM e 60 µM) para cubetas de vidro para realização das leituras em espectrofotômetro à 515 nm. Foi utilizado álcool metílico, como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As concentrações de DPPH (µM) foram plotadas no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y e calculou-se a equação da reta.

Uma alíquota de 0,1 mL de cada extrato, foram colocados em tubos de ensaio contendo 3,9 mL do radical DPPH e homogeneizados em agitador de tubos. Para solução

controle (0,1 mL com álcool metílico, acetona e água), foi misturado em 3,9 mL do radical DPPH. Álcool metílico foi utilizado como branco, para calibrar o espectrofotômetro. As leituras (515 nm) foram monitoradas a cada minuto até sua estabilização.

Após a leitura, o y foi substituído pelo valor correspondente à metade da absorbância inicial do controle (abs inicial do controle / 2) da equação da curva do DPPH para encontrar o consumo em  $\mu\text{M}$  DPPH (valor de x) e, em seguida, transformar para gramas DPPH. A partir das absorbâncias obtidas das diferentes diluições dos extratos, foi plotado a absorbância no eixo Y e diluição (mg/L) no eixo X para determinação da equação da reta. Desse modo, o cálculo da atividade antioxidante total (AAT) consiste em substituir a absorbância equivalente a 50 % da concentração do DPPH pelo y ( $y = -ax + b$ ) e encontrar o resultado que corresponde à amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH [ $x = \text{EC}_{50}$  (mg/L)]. A partir do resultado obtido (mg/L) foi dividido por 1.000 para obter o valor em gramas e, em seguida, dividiu pelo valor encontrado em gramas DPPH para o resultado final.

#### **4.5.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Sistema $\beta$ -caroteno/Ácido Linoleico**

Foram utilizadas soluções de álcool metílico 50% (40 mL) e acetona 70% (40 mL) como preparadas anteriormente, no teste de DPPH. Em um balão volumétrico de 10 mL, dissolveu-se 2 mg de Trolox em 5 mL de álcool 70% depois completou o volume com álcool etílico, no qual a solução foi homogeneizada e transferida para um frasco de vidro âmbar.

Para a solução sistema ( $\beta$ -caroteno/Ácido Linoléico), aproximadamente 500 mL de água destilada foi submetida ao borbulhamento com oxigênio (oxigenador) por 30 minutos. Pesou-se 20 mg de  $\beta$ -caroteno em um tubo de 2 mL, protegido da luz com papel alumínio, onde foi adicionado 1 mL de clorofórmio e agitado. Em um erlenmeyer foram adicionados: 40  $\mu\text{L}$  de ácido linoléico, 530  $\mu\text{L}$  de Tween 40, 50  $\mu\text{L}$  da solução  $\beta$ -caroteno e 1 mL de clorofórmio, homogeneizou-se e o clorofórmio foi colocado para evaporar, com o auxílio do oxigenador. Após esse procedimento, foi adicionada água tratada com oxigênio para se obter uma absorbância entre 0,6 nm e 0,7 nm a 470 nm no espectrofotômetro, a solução sistema apresentou uma coloração amarelo-alaranjada.

Os extratos (0,4 mL) foram colocados em tubos de ensaio contendo 5 mL da solução sistema, homogeneizados e mantidos em banho-maria à 40 °C. A primeira leitura (470 nm)

foi realizada com 2 minutos após a homogeneização e depois em intervalos de quinze minutos até completar 120 minutos.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação. A redução da absorvância do sistema sem antioxidante é considerada como 100% de oxidação ( $Redução\ Abs = Abs\ inicial - Abs\ final$ ).

O decréscimo da leitura da absorvância das amostras é correlacionado com o sistema e estabelece a porcentagem de oxidação ( $\% Oxidação = \frac{[(Redução\ Abs)amostra \times 100]}{(Redução\ Abs)sistema}$ ) subtraindo-se a porcentagem de oxidação de cada amostra de 100 ( $\% Proteção = 100 - (\% Oxidação)$ ).

#### **4.6 Quantificação do teor de fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu**

O método de análise de fenólicos totais consiste em um método colorimétrico onde baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina e é o mais utilizado para a determinação de compostos fenólicos totais em alimentos. A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos é medida espectrofotometricamente, na faixa de absorção visível no comprimento de onda de 735 nm (NUUTILA et al., 2003). As soluções dos extratos de linhaça e da amoreira foram submetidas à quantificação do teor de fenólicos totais no Laboratório de Pós-colheita de Frutas e Hortaliças do Departamento de Ciências dos Alimentos da UFPA seguindo metodologia de Folin-Ciocalteu.

Foi adicionado em tubos de ensaio, 200 µL do extrato, 600 µL de etanol 70%, 400 µL de Folin-Ciocalteu (Merck) e 2000 µL da solução de carbonato de sódio (20% m/v). A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos, incluindo mais 800 µL da solução de carbonato de sódio (20% m/v). Posteriormente, as amostras ficaram mantidas em repouso por 2 horas em temperatura ambiente e em ambiente escuro. A leitura da absorvância foi realizada em comprimento de onda de 735 nm, utilizando-se o espectrofotômetro UV-visível. O ácido gálico foi utilizado como padrão. Ao final, o cálculo do teor de fenólicos foi calculado a partir da curva padrão do ácido gálico em 7 concentrações diferentes, entre 0,100 e 0,600 µg/mL (SINGLETON; ROSSI, 1965).

#### **4.7 Protocolos experimentais**

##### **4.7.1 Administração das soluções**

Após o período de 15 dias para depleção estrogênica e recuperação cirúrgica, todos os

grupos receberam tratamentos por via oral, uma vez por dia, durante 60 dias, no volume aproximado de 500 µl/animal, através do procedimento de gavagem.

O método de gavagem consiste de uma seringa contendo um tubo flexível (ou agulha), com a ponta arredondada e 8 cm de comprimento, o qual foi introduzido na boca do animal e cuidadosamente empurrado pelo esôfago até o estômago para posterior administração das soluções. O volume máximo para roedores é de 1mL de solução para cada 100g de peso corporal, no entanto, se a administração for de solução aquosa, o volume pode ser de até 2mL para cada 100g de peso corporal (GORRITI et al., 2010).

#### **4.7.2 Peso corporal dos animais**

A cada semana, durante os 60 dias de tratamento, os animais foram pesados, com auxílio de uma balança digital eletrônica de precisão SF-400.

#### **4.7.3 Teste Labirinto em Cruz Elevado (LCE)**

Possivelmente este seja o modelo para teste de ansiedade mais empregado na prática atual em animais. A estrutura é elevada 50 cm do solo e formado por dois braços abertos (50 x 10 cm) que formam uma cruz com os dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm), o modelo utilizado do LCE foi o mesmo descrito em estudos prévios (CAMPOS; GUIMARAES, 2008; GUIMARAES et al., 1990). O teste baseia-se na tendência natural dos roedores em explorar novos ambientes. Os braços abertos representam lugares desprotegidos e claros. O confinamento nos braços abertos induz respostas fisiológicas ao estresse (aumento de defecação e corticosterona), e a exposição de animais à drogas ansiolíticas clássicas, como os benzodiazepínicos, aumenta a exploração desses braços (PELLOW; FILE, 1986).

Após o período de tratamento, cada animal foi colocado por 5 minutos no LCE, com a face voltada para um dos braços fechados, e com auxílio de uma câmera digital da marca SONY (W800) foi registrado o teste. Após o registro de cada animal, o LCE foi limpo com álcool 70%.

Para análise comportamental, a sessão foi registrada e analisada com o auxílio do software Any-Maze (Stoelting, EUA), e os seguintes parâmetros foram analisados: entrada e permanência nos braços abertos e fechados do LCE, porcentagem de tempo gasto e porcentagem de entrada nos braços abertos e por fim, permanência no centro do labirinto.

#### **4.7.4 Eutanásia**

Após 60 dias de tratamento e do LCE, os animais foram inicialmente anestesiados

com Ketamina (90mg/kg – Ketamina, Sespo Indústria e Comércio Ltda) e Xilazina (10mg/kg, Rhobifarma Indústria Farmacêutica Ltda) para realização da punção cardíaca e posteriormente realizou-se o método de decapitação. Todos os animais foram eutanasiados no período da manhã, onde foram extraídos os seguintes órgãos: hipófise, fígado, fêmur e útero.

#### **4.7.5 Lavado vaginal**

Após eutanásia, os animais foram submetidos ao lavado vaginal onde utilizou-se uma pipeta feita com ponteira de polietileno (borda romba para evitar lesões na parede vaginal) provinda de uma micropipeta, e látex de garrote com um nó na ponta, para conter aproximadamente 0,3 ml de solução salina 0,9%. Assim, a solução salina foi injetada, aspirada e colocada em uma lâmina, para visualização em microscópio, da marca Olympus CX22 RFS2, com objetiva de 10 e 40X (VILELA et al., 2007).

#### **4.8 Peso hipofisário**

A hipófise de cada animal foi coletada e imediatamente fixada em solução de formalina à 10% por 72 horas. A hipófise foi seca em papel toalha para posterior pesagem. O peso da hipófise foi obtido com auxílio de uma balança analítica com sensibilidade de 0,0001g, modelo PA214P da marca OHAUS.

#### **4.9 Análises bioquímicas**

Amostra de sangue dos animais dos diferentes grupos foi coletada, por punção cardíaca, e transferida ao tubo de ensaio contendo EDTA para posterior centrifugação (3500 rpm por 20 minutos), o plasma foi coletado e armazenado em freezer (-80°C). As análises bioquímicas foram realizadas no laboratório de Bioquímica do departamento de Química da UFLA.

##### **4.9.1. Perfil lipídico**

##### **4.9.1.1 Colesterol total (CT), triacilgliceróis (TAG), lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL)**

As concentrações de CT e TAG foram determinadas por sistema enzimático da BioTécnica, sendo realizado o mesmo procedimento para as duas quantificações, no qual foi pipetado em diferentes tubos de ensaio: padrão (10 µL STD e 1 mL tampão R1), amostra (10 µL amostra e 1 mL R1) e o branco (1 mL tampão R1), os mesmos foram homogeneizados e incubados à 37 °C durante 10 minutos. A leitura foi feita a partir de espectrofotômetro a 505 nm.



O VLDL foi calculado pela fórmula  $VLDL = \text{Triacilglicerol}/5$  e o LDL pela diferença entre CT e (HDL+VLDL).

#### 4.9.1.2 Lipoproteína de alta densidade (HDL)

Inicialmente o procedimento para determinação de HDL consistiu em pipetar em tubos de ensaio: 250 mL plasma e 250 mL do reagente precipitante, foram agitados em Vortex e colocados para centrifugação a 3500 rpm durante 15 minutos. Foi retirado o sobrenadante límpido que contém o colesterol HDL. Em tubos de ensaio, foram pipetados 50  $\mu\text{L}$  R1 e 1 mL reagente enzimático (para o padrão); 50  $\mu\text{L}$  sobrenadante e 1 mL reagente enzimático (para a amostra) e por fim, no branco, foi utilizado apenas 1 mL do reagente enzimático. Após homogeneização e banho-maria à 37 °C, o zero foi ajustado com o branco, e a leitura das absorbâncias, da amostra e do padrão foram feitas em 500 nm (490 - 540 nm).

O HDL foi calculado a partir da equação:  $HDL \left( \frac{mg}{dL} \right) = \frac{abs amostra}{abs padrão} \times 100$ .

#### 4.9.1.3 Lipase

Utilizando o reagente proveniente da BioTécnica, o procedimento do ensaio consistiu em ajustar à temperatura do fotômetro em 37 °C, com o comprimento de onda 580nm e o zero foi com água destilada. Pipetou em tubo de ensaio: 800  $\mu\text{L}$  R1, 10  $\mu\text{L}$  da amostra e 200  $\mu\text{L}$  de R2, homogeneizou e inseriu na cubeta termostatizada. Foi acionado o cronômetro, onde foi registrado absorbância aos 90 segundos (A1) e aos 180 segundos (A2) do branco, da amostra e do calibrador. A lipase foi calculada a partir da equação:

$$Lipase \left( \frac{U}{L} \right) = \left( \frac{(abs amostra 180 - abs amostra 90)}{0,186} \right) \times 157.$$

#### 4.9.2 Ácido Úrico

Com auxílio do kit da BioTécnica foi pipetado em tubos de ensaio: padrão (20  $\mu\text{L}$  STD e 1 mL R1), amostra (20  $\mu\text{L}$  amostra e 1 mL R1) e o branco (1 mL R1), os tubos foram homogeneizados e incubados à 37 °C durante 10 minutos. A leitura foi feita a partir de espectrofotômetro a 505 nm. Para análise do ácido úrico, a fórmula foi a seguinte:

$$\text{Ácido Úrico} \left( \frac{mg}{dL} \right) = \frac{abs amostra}{abs padrão} \times 100$$

#### 4.9.3 Transaminase Glutâmico-Oxalacética (TGO)

Com auxílio do kit de reagente proveniente da Bioclin, inicialmente foi preparado o hidróxido de sódio (0,4N) no qual foi transferido o conteúdo do frasco de número 3 (Hidróxido de Sódio Concentrado - 40 mL) para um balão volumétrico de 500 mL

completando com água destilada. Para a curva de calibração foram pipetados em tubos da seguinte maneira, seguindo a Tabela 1.

Tabela 1 - Curva de calibração de TGO.

Tubo	Padrão	Substrato TGO	Água destilada	TGO U/mL
1	-	1,0 mL	200 µL	0
2	100 µL	0,9 mL	200 µL	24
3	200 µL	0,8 mL	200 µL	81
4	300 µL	0,7 mL	200 µL	114
5	400 µL	0,6 mL	200 µL	190

Fonte: Bioclin

Adicionou-se em cada tubo 1,0 mL do Reagente 2 (Reagente de Cor), homogeneizou e deixou em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Depois, foi adicionado 10 mL de Hidróxido de Sódio de Uso (0,4 N), homogeneizando bem e deixado em repouso por 5 minutos. As absorbâncias foram determinadas em 505 nm e para o zero foi utilizado água destilada. A curva de calibração foi traçada, onde os valores de absorbância foram colocados na ordenada, e na abcissa os valores de Unidades/mL. Assim, utilizou-se equação da reta, para cálculo das amostras, sendo:  $y$  (abs amostra) =  $ax + b$ .

#### 4.9.4 Transaminase Glutâmico-Pirúvica (TGP)

A partir de kit reagente da Bioclin, a quantificação de TGP consistiu inicialmente no preparo do hidróxido de sódio (0,4N), em que foi transferido o conteúdo do frasco de número 3 (Hidróxido de Sódio Concentrado - 40 mL) para um balão volumétrico de 500 mL completando com água destilada. Para a curva de calibração foram pipetados diferentes tubos da seguinte maneira, seguindo a Tabela 2.

Tabela 2 - Curva de calibração de TGP.

Tubo	Padrão	Substrato TGO	Água destilada	TGO U/mL
1	-	1,0 mL	200 µL	0
2	100 µL	0,9 mL	200 µL	28
3	200 µL	0,8 mL	200 µL	57
4	300 µL	0,7 mL	200 µL	97
5	400 µL	0,6 mL	200 µL	150

Fonte: Bioclin

Em cada tubo foram adicionados 1,0 mL do Reagente 2 (Reagente de Cor), homogeneizados e colocados em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Depois, acrescentou 10 mL de Hidróxido de Sódio de Uso (0,4 N), homogeneizando bem e deixou em

repouso por 5 minutos. As absorvâncias foram determinadas em 505 nm e para o zero foi utilizado água destilada. A curva de calibração foi traçada, onde os valores de absorvância foram colocados na ordenada, e na abcissa os valores de Unidades/mL. Desse modo, foi utilizada equação da reta, para cálculo das amostras, sendo:  $y$  (abs amostra) =  $ax + b$ .

#### **4.10 Coleta e clivagem do útero, fígado e fêmur**

##### **4.10.1 Útero e fígado**

O útero e o fígado foram coletados por inteiro e clivados em salina. Posteriormente o material foi fixado em solução de formalina à 10% por pelo menos 48 horas.

##### **4.10.2 Fêmur**

O fêmur esquerdo foi retirado e teve todo tecido mole removido e foi colocado em formalina à 10% por 48 horas e depois colocado em álcool etílico 70%.

##### **4.10.2.1 Descalcificação do fêmur com EDTA**

Para o preparo da solução descalcificadora foi dissolvido 50g de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) em 1000 ml de água destilada e adicionou 4,5 g de hidróxido de sódio para obter pH entre 6,5 a 7,0. O fêmur foi mantido suspenso nesta solução envolvido com gaze. Foi realizada trocas da solução descalcificadora a cada três dias e para confirmar a descalcificação completa, foi introduzida uma agulha no tecido e testada sua resistência.

Após a descalcificação, cortes transversais e longitudinais foram realizados, para a obtenção apenas do trocânter maior e o colo, junto com a cabeça do fêmur e colocados em água destilada por 2 horas (a fim de evitar a formação de crosta descalcificada precipitada na superfície da peça), e depois transferidos para álcool 70%.

#### **4.11 Procedimentos do preparo histológico**

Após as amostras serem clivadas e colocadas em cassetes, estas foram submetidas ao Histotécnico para desidratação em série gradativa de álcool etílico (70, 80, 90, 95 e 100%, durante 20 minutos cada), diafanização em xilol (dois banhos de 15 minutos cada) e embebido em parafina à 60°C (dois banhos de 40 minutos cada).

Os blocos de parafina contendo as amostras foram seccionados em micrótomo na espessura de 4µm e as secções colocadas em lâminas de vidro e submetidas à coloração de Hematoxilina-Eosina (HE), para a observação da morfologia geral do tecido. Para isso, os cortes foram desparafinados, hidratados e corados com Hematoxilina de Harris por 2

minutos. Posteriormente, foram lavados em água corrente (2 minutos) e corados com eosina durante 4 minutos. Ao final, os cortes foram novamente desidratados, diafanizados, para que assim, as lâminas pudessem ser montadas com bálsamo do Canadá sintético e uma lamínula sobrepondo (adaptado de JUNQUEIRA, 1983).

#### **4.12 Análise histomorfométrica do útero**

Para cada animal foram confeccionados seis cortes histológicos e analisado o terço médio dos cornos direito e esquerdo. Posteriormente, foram capturadas três fotos por grupo, utilizando fotomicroscópio da marca Olympus CX22 RFS2 com câmera digital SC30 com objetiva de 10X. O parâmetro analisado foi a espessura endometrial ( $\mu\text{m}$ ), no qual foram efetuadas seis medidas em pontos equidistantes, para cada animal. A medida do endométrio foi delimitada manualmente e obtida pela distância da superfície apical das células luminiais, até o limite do miométrio, essas análises foram feitas com auxílio do sistema de análise de imagens *ImageJ*, versão 4.5.0.29 (National Institutes of Health, EUA).

#### **4.13 Análise histomorfométrica óssea**

Após o preparo histológico, quatro cortes histológicos foram feitos para cada fêmur e utilizando o fotomicroscópio da marca Olympus CX22 RFS2 com câmera digital SC30, foram capturados dois campos de cada seção, sendo os campos da cabeça do fêmur abaixo do disco epifisário e do colo do fêmur, abrangendo toda extensão. A partir das imagens capturadas foram realizadas medidas através do sistema *ImageJ*, versão 4.5.0.29 (National Institutes of Health, EUA). As medidas foram de toda extensão, com aumento de 10X. A proporção de área total trabecular foi obtida de cada animal a partir de pontos dentro da trabécula, contendo sobreposição de 432 pontos (intersecções) para imagens obtidas em um total de 2 campos por área, totalizando 864 pontos no total/campo/animal.

#### **4.14 Análise histopatológica do fígado**

Os cortes de fígado dos animais, dos diferentes grupos, foram analisados no laboratório de histopatologia no Setor de Patologia Veterinária do departamento de medicina veterinária da UFLA. E o exame histopatológico teve como objetivo avaliar a integridade tecidual hepática. As lâminas foram examinadas às cegas com o auxílio de uma patologista veterinária, sendo utilizado o sistema de escore histológico para doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), adaptado (BEDOSSA et al., 2012; KLEINER et al., 2005).

Quanto à natureza, foi analisado se houve presença de esteatose, balonização das

células hepáticas, infiltração de células inflamatórias, necrose, congestão de vasos, fibrose, entre outros achados. Para isso, foram estabelecidos escores para classificação dos resultados, com base no tipo de lesão e na intensidade das lesões, sendo para: Esteatose: 0 (< 5%), 1 (5-33%), 2 (33 - 66%) e 4 (>66%); Inflamação: 0 (sem foco), 1 (2-4 focos por campo de 10x), 2 (4-8 focos por campo de 10x), 3 (mais de 8 focos por campo de 10x); Fibrose: 0 (sem fibrose), 1 (perisinusoidal ou periportal), 2 (perisinusoidal e periportal), 3 (em ponte), 4 (cirrose); Relação núcleo/citoplasma (balonização): 0 ( $\leq 1:2$ ), 1 (1:2 a 1:3), 2 (1:3 a 1:4) e 3 ( $\geq 1:4$ ). Por fim, fez-se o somatório dos escores a fim de verificar a sobreposição de lesões.

#### **4.15 Análise estatística**

Os dados de cada variável foram submetidos às análises de variância pelo teste F e as médias dos tratamentos foram agrupados pelo teste de Scott–Knott (1974) à 5% de probabilidade. As análises foram geradas pelo programa R (R CORE TEAM, 2014) e os gráficos foram gerados no programa Prisma (GRAPHPAD PRISM 5).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 RESULTADOS

#### 5.1.1 Análise antioxidante e fenólicos totais

Tabela 3 - Capacidade antioxidante pela porcentagem de inibição da oxidação (DPPH e  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico) e Compostos Fenólicos Totais (CFT) dos extratos de linhaça e de amoreira.

Extrato	IC50	% Inibição da oxidação		CTF
	(mg/mL)	DPPH	$\beta$ -caroteno/ác. linoleico	(mg EAG/100g)
<b>Linhaça</b>	6.93 $\pm$ 0.431	74.55 $\pm$ 4.64	-	1395.4 $\pm$ 11.83
<b>Amoreira</b>	0.04 $\pm$ 0.007	73.44 $\pm$ 14.1	44.77 $\pm$ 28.90	1482.6 $\pm$ 37.08

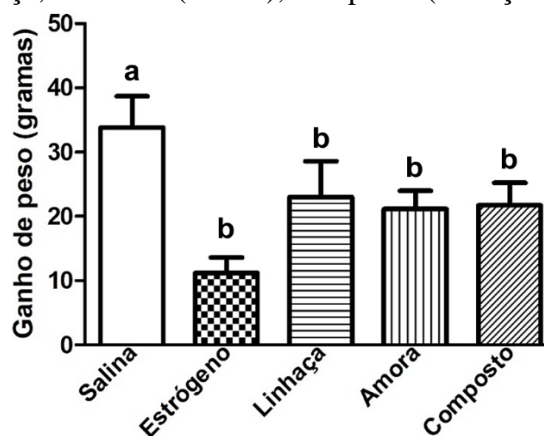
Legenda: IC50: Concentração mínima de extrato, em mg/mL, necessária para o antioxidante (amostra) reduzir em 50% o radical DPPH inicial da reação; EAG: equivalentes de ácido gálico. Os valores representam as médias  $\pm$  desvio padrão.

A porcentagem de inibição do extrato de linhaça em sequestrar o radical DPPH foi de 74,55% e do extrato de amoreira foi de 73,44%. Somente o extrato de amoreira apresentou atividade antioxidante pelo sistema beta-caroteno/ácido linoleico no valor de 44,77%, pois quando avaliou o extrato de linhaça, não foi possível quantificar (TABELA 3).

O teor de fenólicos totais dos extratos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso em miligramas de EAG (equivalentes de ácido gálico) por 100 gramas de extrato. O extrato de amoreira apresentou teor de fenólicos totais (1482,6  $\pm$  37 mg EAG/100g de extrato) e o extrato de linhaça apresentou teor de fenólicos totais no valor de 1395,4 $\pm$ 11 mg EAG/100g de extrato (TABELA 3).

#### 5.1.2 Ganho de peso

Figura 2 - Ganho de peso (gramas) em 60 dias, dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira).

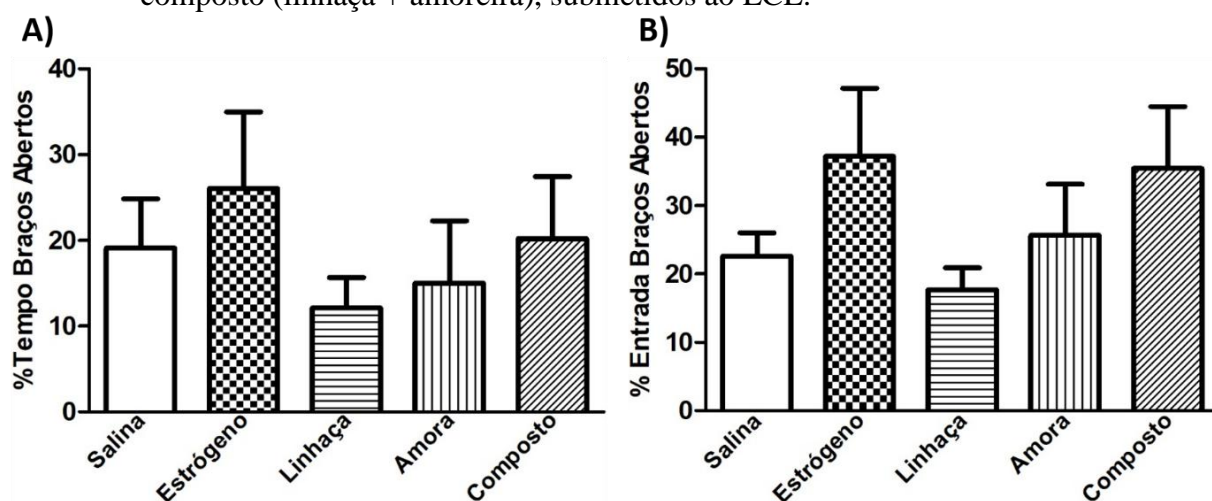


Legenda: As barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão.

Houve menor ganho de peso nos animais tratado com estrógeno em relação ao grupo que recebeu salina, além disso, os animais tratados com extratos de linhaça, amoreira e composto apresentaram resultados semelhantes aos tratados com estrógeno (FIGURA 2).

### 5.1.3 Teste labirinto em cruz elevado

Figura 3 - Porcentagem de tempo de permanência (A) e de entrada nos braços abertos (B) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira), submetidos ao LCE.

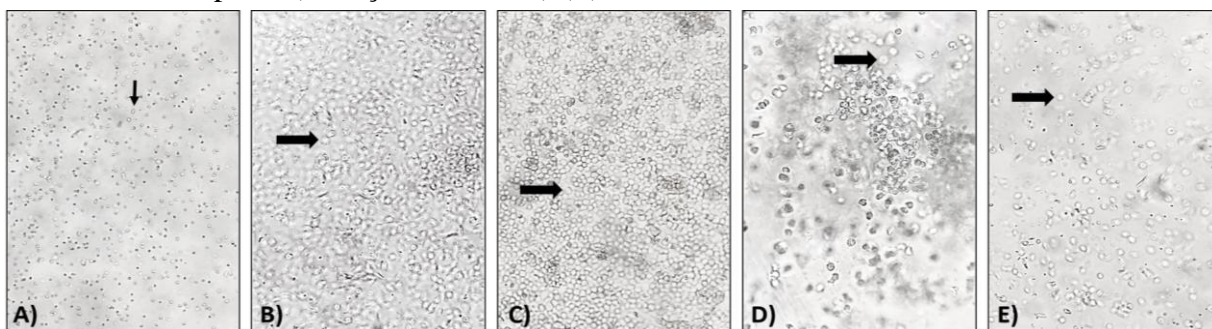


Legenda: Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão.

No teste do labirinto em cruz elevado, não houve diferença quanto ao tempo de permanência e frequência de entrada nos braços aberto, entre os animais submetidos aos diferentes tipos de tratamentos (FIGURA 3).

### 5.1.4 Células presentes no lavado vaginal

Figura 4 - Fotomicroscopia (10X) das células presentes no lavado vaginal dos animais tratados com salina (A), estrógeno (B), extrato de linhaça (C), amoreira (D) e composto (linhaça + amoreira) (E).



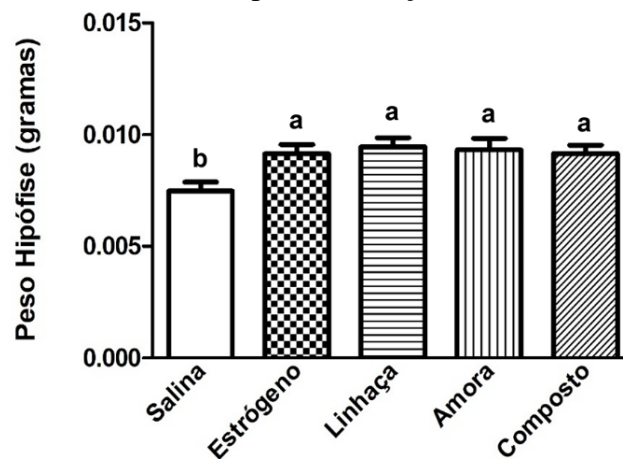
Legenda: Seta fina indica célula leucocitária; Seta grossa indica célula epitelial.

Os animais que receberam salina (a) demonstraram predomínio de células leucocitárias. Já nos animais tratados com estrógeno (b), foi observado células epiteliais, que

são observadas nos animais na fase de proestro, características estas de ação estrogênica no epitélio vaginal. Os animais tratados com extratos de linhaça (c), amoreira (d) e composto (e) apresentaram células semelhantes aos animais tratados com estrógeno, demonstrando uma possível ação estrogênica destas suplementações.

### 5.1.5 Peso da hipófise

Figura 5 - Peso da hipófise (gramas) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira).



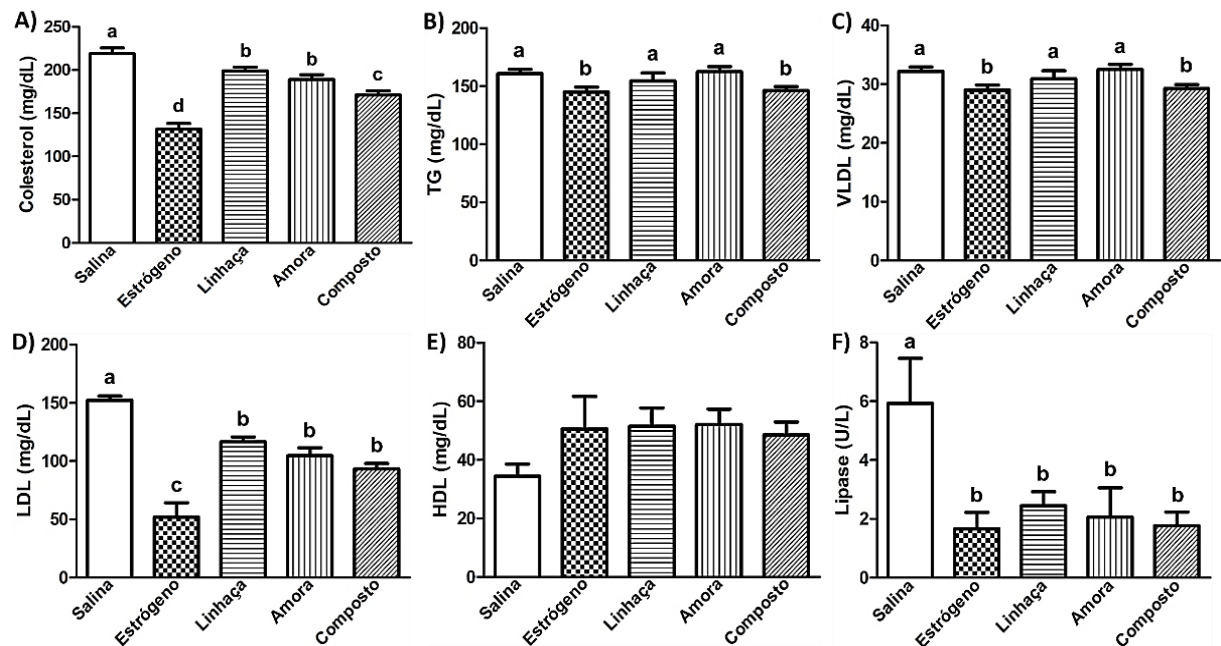
Legenda: As barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão.

Houve aumento do peso hipofisário dos animais tratado com estrógeno em relação ao grupo tratado com salina, além disso, os grupos tratados com extratos de linhaça, amoreira e composto, exibiram resultados semelhantes ao grupo tratado com estrógeno comparado ao grupo salina.



### 5.1.6 Perfil lipídico

Figura 6 - Concentrações plasmáticas de Colesterol total (mg/dL) (A), triacilglicerol (TAG-mg/dL) (B), VLDL (mg/dL) (C), LDL (mg/dL) (D), HDL (mg/dL) (E), Lipase (U/L) (F) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira).



Legenda: TAG: triacilglicerol; VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; HDL: lipoproteína de alta densidade. As barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão.

Os animais tratados com estrógeno demonstraram redução na concentração plasmática de colesterol total em comparação aos outros grupos. Os animais que receberam extratos de linhaça, amoreira e composto apresentaram redução nas concentrações de colesterol total em comparação ao grupo tratado com salina (FIGURA 6A).

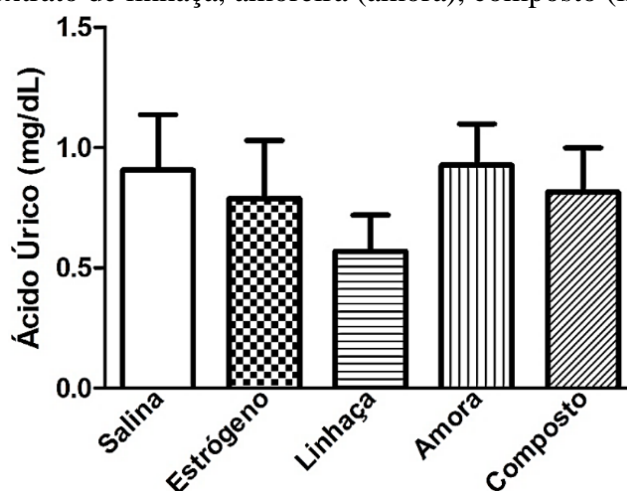
Para triacilglicerol e VLDL, o grupo composto (linhaça + amoreira) e estrógeno apresentaram redução significativa quando comparado ao grupo salina, linhaça e amora (FIGURA 6B/C). Entretanto, os animais tratados com extratos de linhaça ou amoreira não apresentaram diferença significativa dos animais tratados com salina.

Além disso, os animais tratados com estrógeno demonstrou redução na concentração plasmática de LDL em comparação com os outros grupos estudados. Já a suplementação com os extratos de linhaça, amoreira e composto promoveu redução significativa nas concentrações de LDL em relação ao grupo salina (FIGURA 6D). Porém, em relação as

concentrações plasmáticas de HDL, não foram observadas diferenças entre os tratamentos (FIGURA 6E). Por fim, houve redução da concentração de lipase nos animais tratados com estrógeno, extratos de linhaça, amoreira e composto, em relação aos animais tratados com salina (FIGURA 6F).

### 5.1.7 Ácido úrico

Figura 7 - Concentrações plasmáticas de ácido úrico (mg/dL) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira).

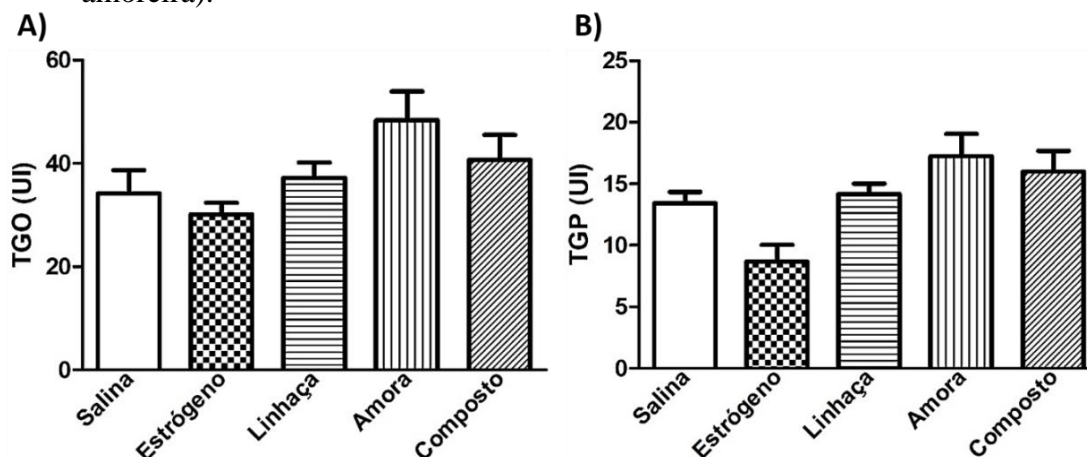


Legenda: Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão.

Não foram observadas alterações significativas nas concentrações plasmáticas de ácido úrico nos diferentes grupos estudados, como demonstrado na Figura 7.

### 5.1.8 TGO e TGP

Figura 8 - Concentrações plasmáticas de TGO (UI) (A) e TGP (UI) (B) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira).

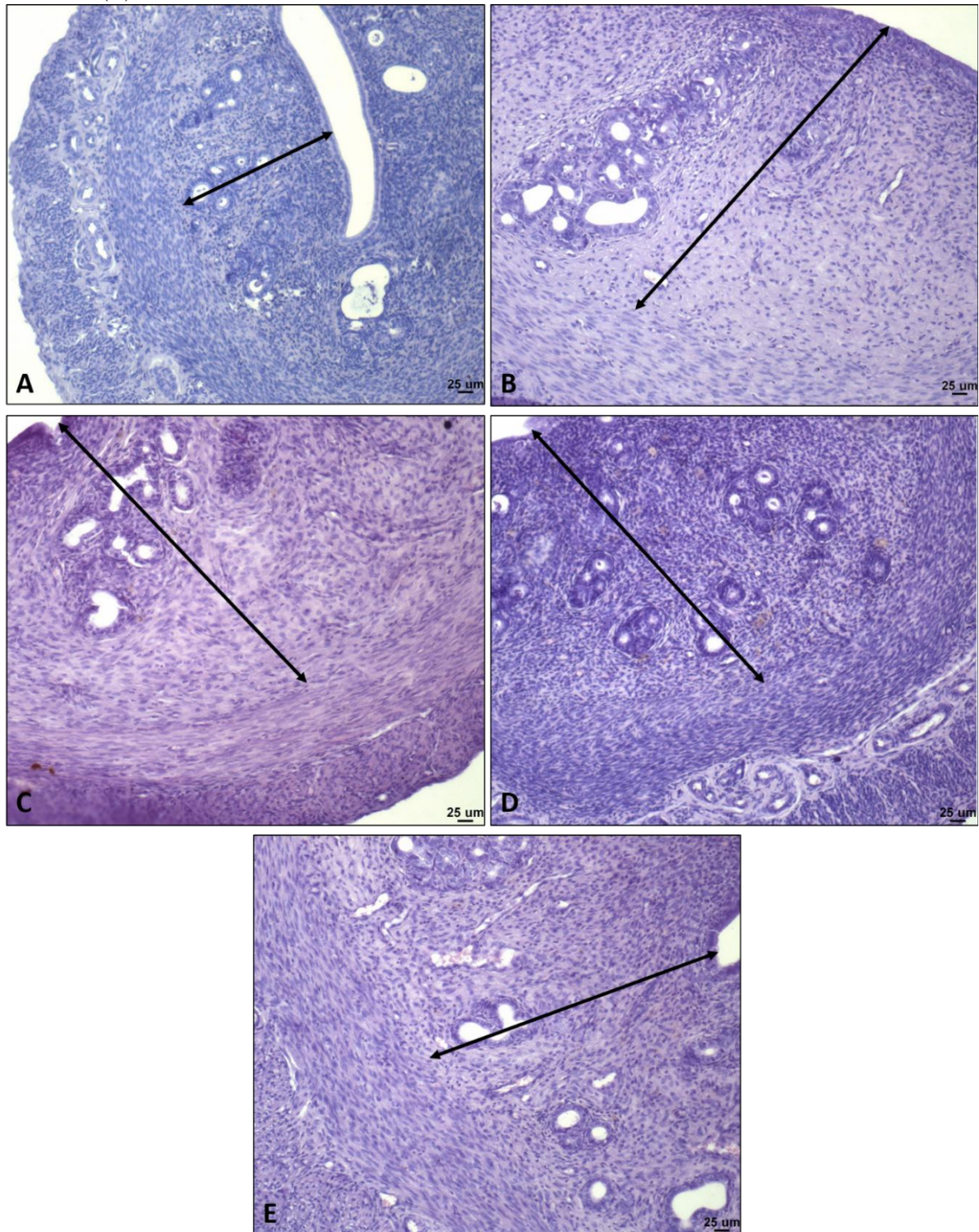


Legenda: TGO: transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: transaminase glutâmico-pirúvica. Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão.

Em relação às análises de TGO (transaminase glutâmico-oxalacética) e TGP (transaminase glutâmico-pirúvica), não foram observadas diferenças significativas entre os diferentes tipos de tratamentos, porém todos estiveram dentro dos parâmetros de normalidade (FIGURA 8).

### 5.1.9 Espessura endometrial

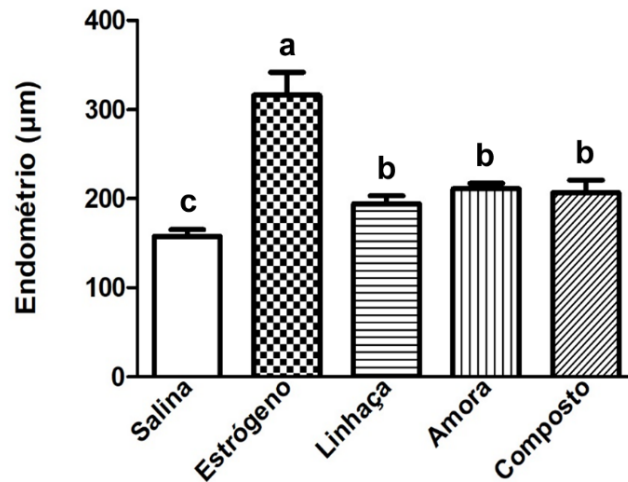
Figura 9 - Fotomicroscopia (HE; 10X) do endométrio dos animais tratados com salina (A), estrógeno (B), extrato de linhaça (C), amoreira (D) e composto (linhaça + amoreira) (E).



Legenda: Comprimento da seta: espessura do endométrio ( $\mu\text{m}$ ).



Figura 10 - Comprimento endometrial ( $\mu\text{m}$ ) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira).

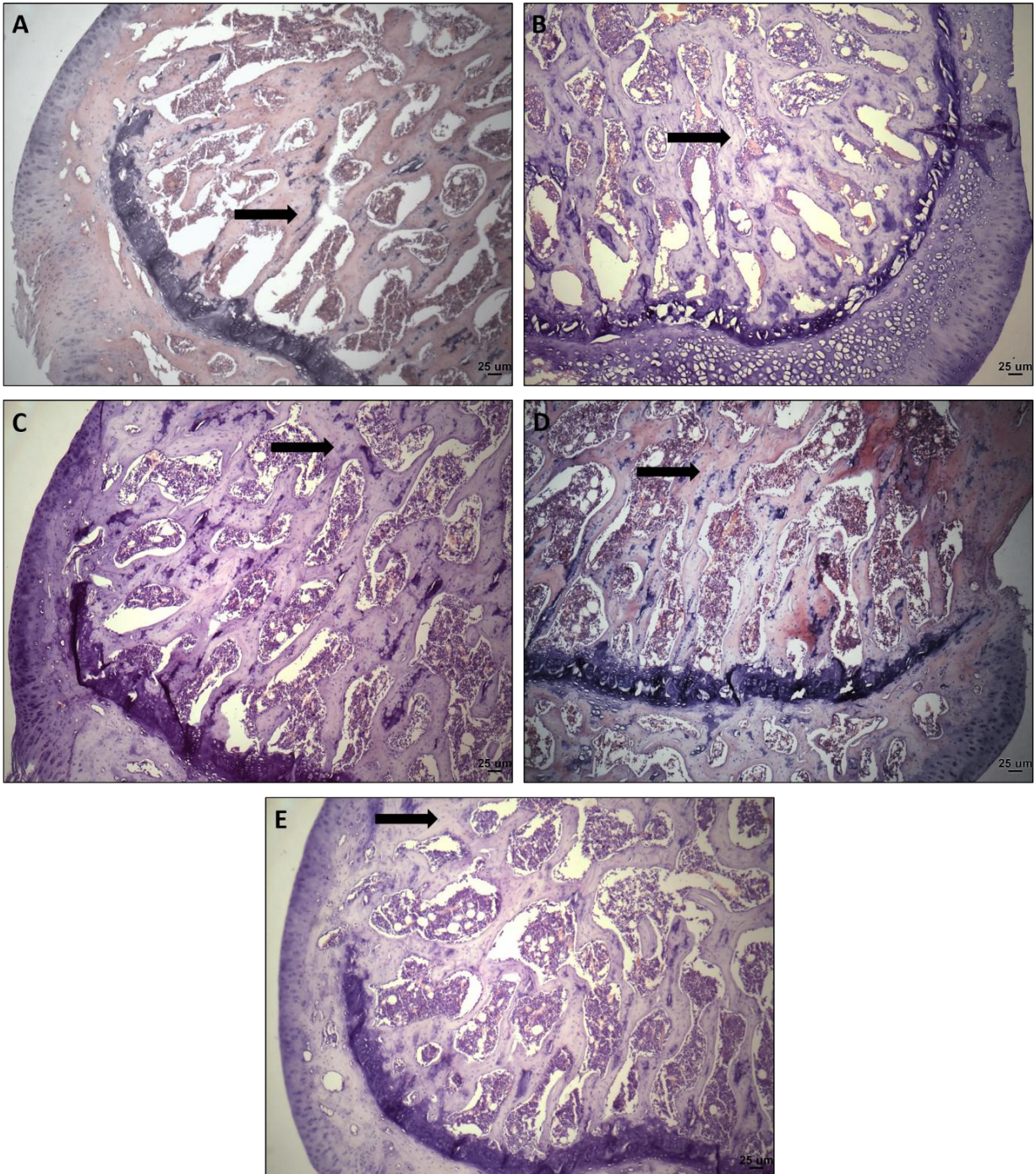


Legenda: As barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão.

De acordo com a Figura 10, os animais tratados com estrógeno demonstraram maior espessura endometrial quando comparado aos demais grupos analisados. Não houve diferença endometrial entre os animais tratados com linhaça, amoreira e composto, porém, estes animais apresentaram espessura endometrial maior que os animais tratados com salina.

### 5.1.10 Porcentagem trabecular óssea (cabeça e colo do fêmur)

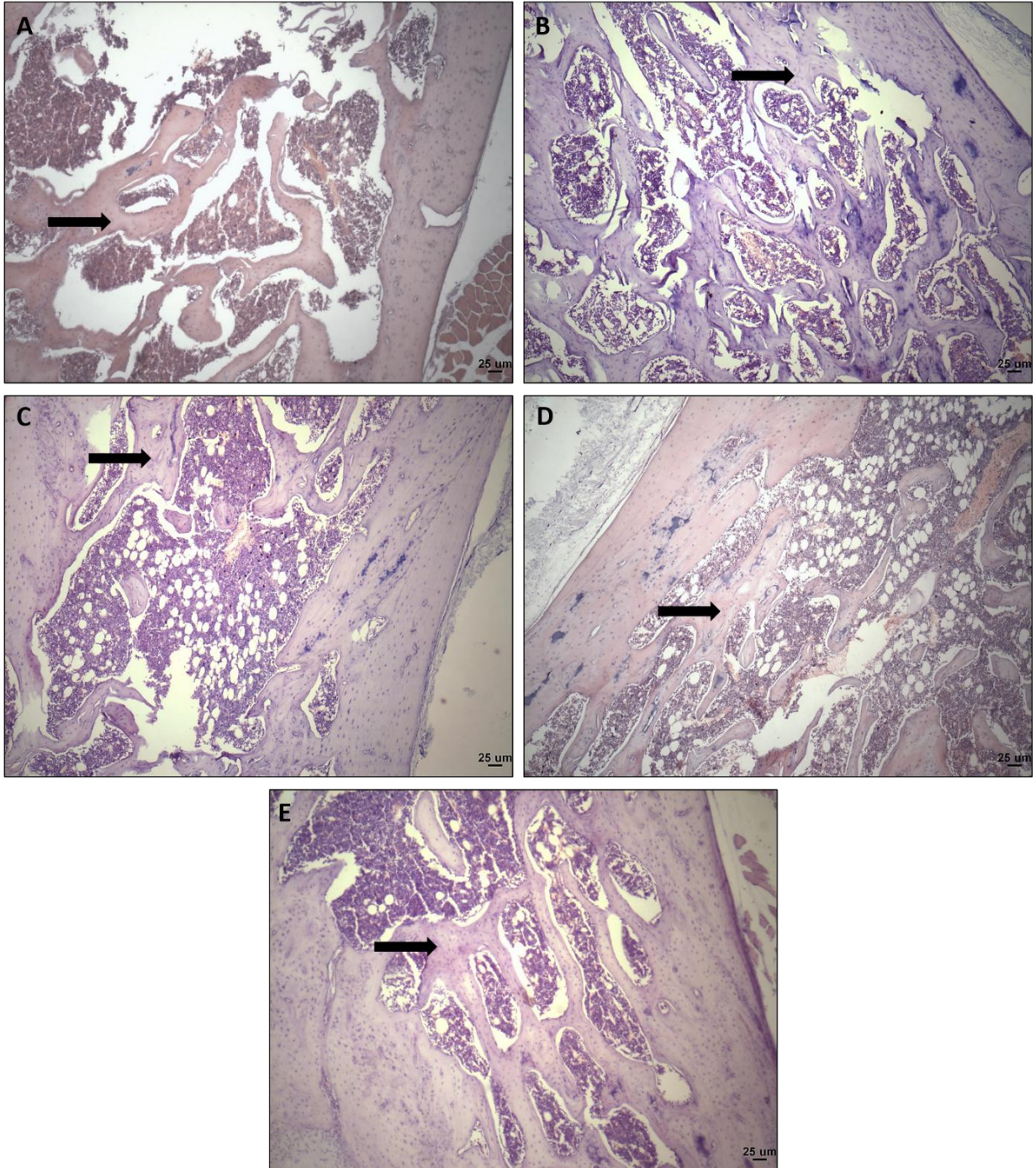
Figura 11 - Fotomicroscopia (HE; 20X) do osso trabecular, da cabeça do fêmur dos animais tratados com salina (A), estrógeno (B), extrato de linhaça (C), amoreira (D) e composto (linhaça + amoreira) (E).



Legenda: A seta indica trabécula óssea.

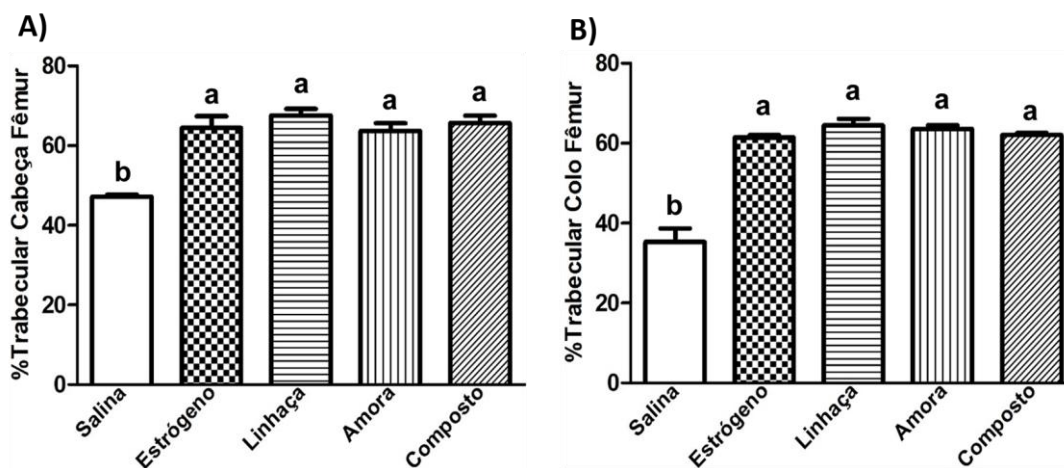


Figura 12 - Fotomicroscopia (HE; 20X) do osso trabecular, do colo do fêmur dos animais tratados com salina (A), estrogênio (B), extrato de linhaça (C), amoreira (D) e composto (linhaça + amoreira) (E).



Legenda: A seta indica trabécula óssea.

Figura 13 - Porcentagem de osso trabecular, na cabeça (A) e no colo do fêmur (B) dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira (amora), composto (linhaça + amoreira).



Legenda: As barras com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Os valores representam médias  $\pm$  desvio padrão.

Após 60 dias de tratamento, os fêmures dos animais foram retirados e submetidos à análise histomorfométrica, na qual foi analisada a porcentagem de trabécula que corresponde à quantidade de osso presente. Os animais que foram tratados com estrógeno, extratos de linhaça, amoreira e composto, apresentaram uma porcentagem maior de trabéculas intactas em comparação ao grupo tratado com salina, demonstrando uma menor perda óssea nos animais tratados com estrógeno e suplementos em comparação aos tratados com salina (FIGURA 12).



### 5.1.11 Histopatologia do fígado

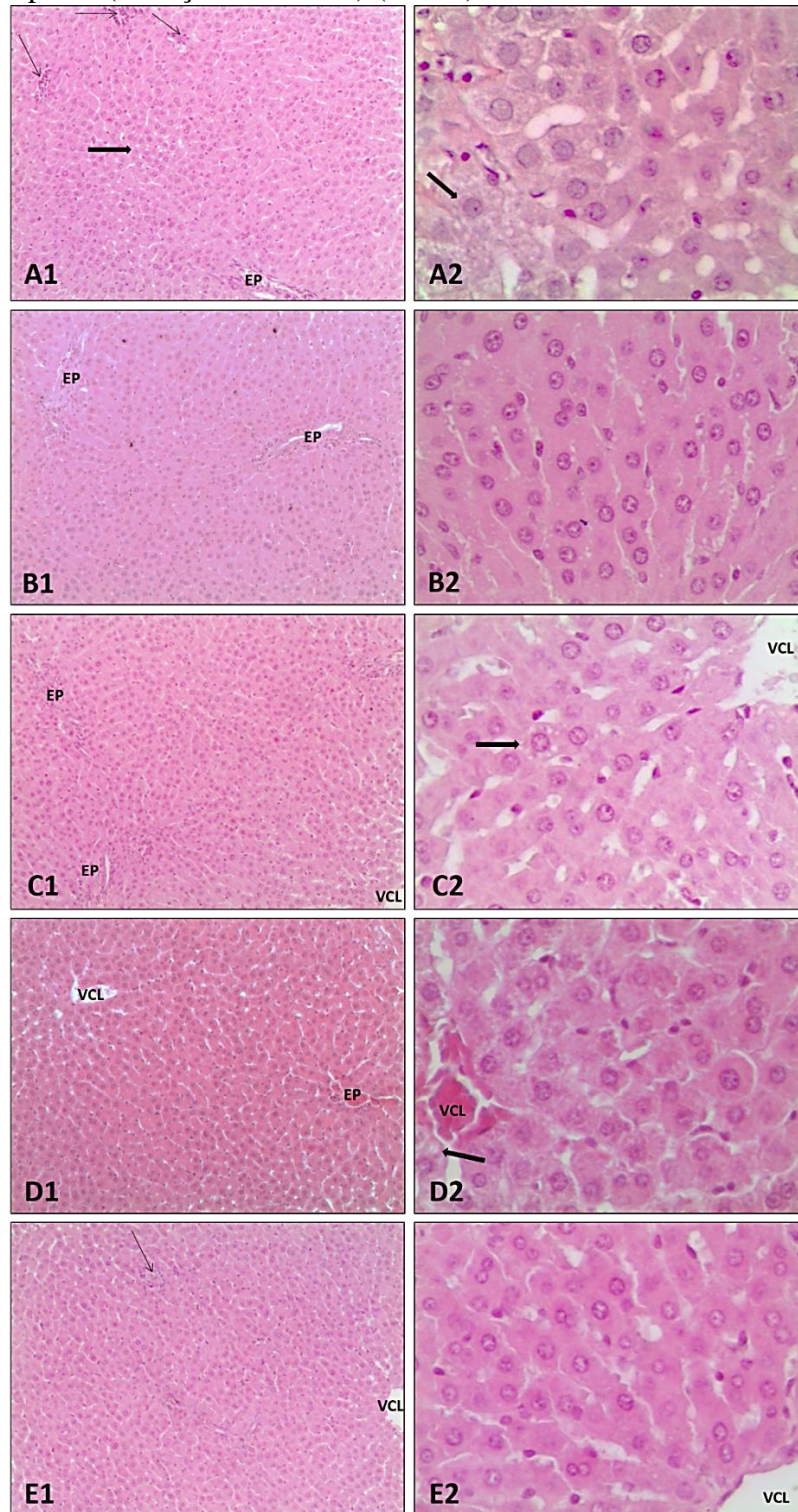
Tabela 4 - Resultados das análises histopatológicas do fígado dos animais tratados com salina, estrógeno, extrato de linhaça, amoreira e composto (linhaça + amoreira). Adaptado de Kleiner et al. (2005).

Alterações	Definição	Escore	Grupos				
			Salina	Estrógeno	Linhaça	Amoreira	Composto
<b>Esteatose</b>	<5%	0	50%	100%	71.40%	85.70%	100%
	5 - 33%	1	50%	0	28.50%	14.20%	0
	33 - 66%	2	0	0	0	0	0
	>66%	3	0	0	0	0	0
<b>Inflamação</b>	sem foco	0	66.60%	80%	71.40%	85.70%	57.10%
	2-4 focos/campo 10X	1	33.30%	20%	14.20%	14.20%	42.80%
	4-8 focos/campo 10X	2	0	0	14.20%	0	0
	> 8 focos/campo 10X	3	0	0	0	0	0
<b>Fibrose</b>	sem fibrose	0	100%	100%	100%	100%	100%
	perisinusoidal ou periportal	1	0	0	0	0	0
	perisinusoidal e periportal	2	0	0	0	0	0
	em ponte	3	0	0	0	0	0
	cirrose	4	0	0	0	0	0
<b>Balonização</b>	≤ 1:2	0	100%	100%	100%	100%	100%
	1:2 a 1:3	1	0	0	0	0	0
	1:3 a 1:4	2	0	0	0	0	0
	≥ 1:4	3	0	0	0	0	0
<b>Escore Total</b>		0	33.30%	80%	57.10%	71.40%	57.10%
		1	50%	20%	28.50%	28.50%	42.80%
		2	16.60%	0	0	0	0
		3	0	0	14.20%	0	0

Legenda: Esteatose: 0 (< 5%), 1 (5-33%), 2 (33 - 66%) e 3 (>66%); inflamação: 0 (sem foco), 1 (2-4 focos por campo de 10X), 2 (4-8 focos por campo de 10X), 3 (mais de 8 focos por campo de 10X); fibrose: 0 (sem fibrose), 1 (perisinusoidal ou periportal), 2 (perisinusoidal e periportal), 3 (em ponte), 4 (cirrose); relação núcleo/citoplasma (balonização): 0 (≤ 1:2), 1 (1:2 a 1:3), 2 (1:3 a 1:4) e 3 (≥ 1:4); escore total: somatório de todos os escores.

Por meio da análise histopatológica do fígado, de acordo com a Tabela 4, alterações comumente observadas em casos de DHGNA não foram evidenciadas, porém os animais tratados com salina apresentaram maior número de alterações, sendo apenas 33.3% dos animais desse grupo, com escore 0. Desse modo, os animais que receberam salina, apresentaram predomínio de hepatócitos com acúmulo de gordura, caracterizando esteatose, e focos de inflamação. Somente um dos animais do grupo tratado com extrato de linhaça apresentou alterações que resultaram em maior escore (3), no entanto, não houve diferença estatística quando comparado com os demais grupos.

Figura 14 - Fotomicroscopia (HE; 10X e 20X) do fígado dos animais tratados com salina (A1/A2), estrógeno (B1/B2), extrato de linhaça (C1/C2), amoreira (D1/D2) e composto (linhaça + amoreira) (E1/E2).



Legenda: Seta fina indica infiltrado inflamatório; Seta grossa indica esteatose; EP: espaço porta; VCL: veia centro lobular.

Através da análise histopatológica, observa-se que os animais tratados com salina apresentaram agregados de células inflamatórias, totalizando 3 por campo de 10X (grau 1) (A1) e uma moderada vacuolização dos hepatócitos, com discreta distorção da arquitetura e maior quantidade de células com acúmulo de gotículas de gordura (A2). Já os animais tratados com estrógeno apresentaram arquitetura tecidual normal e nenhuma vacuolização (B1 e B2), sendo o mesmo observado nos animais que receberam o composto (E1 e E2). Os animais que receberam o extrato de linhaça apresentaram arquitetura do tecido normal (C1), cordões de hepatócitos em fileira, com proporção núcleo:citoplasma (1:2), apresentando somente um hepatócito com discreta vacuolização (C2). Por fim, os animais tratados com extrato de amoreira também demonstraram uma arquitetura tecidual normal (D1), verificando os hepatócitos com citoplasma menos eosinofílico e poucas células vacuolizadas (D2).

## 5.2 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como intuito investigar os efeitos dos extratos de linhaça e/ou amoreira no organismo de ratas ovariectomizadas, como uma alternativa natural para terapia de reposição hormonal ou para melhora dos sintomas da menopausa. A redução estrogênica promovida pela ovariectomia resulta aos animais maior ganho de peso e adiposidade, mudanças no perfil lipídico (GOETTEMS-FIORIN et al., 2019), redução expressiva da massa óssea trabecular do fêmur, aumento na deposição de gordura medular e atrofia uterina (OCCHIUTO et al., 2007).

No nosso estudo foi possível observar que os animais tratados com os extratos de linhaça e/ou amoreira, mesmo após ovariectomia, apresentaram menor ganho de peso após 60 dias de tratamento, apresentaram predomínio de células epiteliais vaginais no lavado vaginal, semelhantemente à fase de proestro, melhora do perfil lipídico, aumento da espessura endometrial e peso hipofisário, menor reabsorção óssea, e por fim, apresentaram baixa toxicidade hepática após o tratamento, resultados estes semelhantes ao grupo tratado com estrógeno.

### 5.2.1 Atividade Antioxidante Total

A atividade antioxidante apresentada por extratos de frutas e plantas dependem de vários fatores, tais como a concentração, temperatura, caráter hidrofóbico e hidrofílico, caráter anfipático, presença de sinergismo e a natureza química ou do meio aos quais são adicionados (LAGOURI; BOSKOU, 1995). Além disso, esta atividade geralmente está relacionada à presença de compostos fenólicos, que, por sua vez, vem ganhando destaque no decorrer dos anos, principalmente devido às suas propriedades redutoras (SOUSA et al., 2007).

#### 5.2.1.1 DPPH

As lignanas tem demonstrado grande poder antioxidante e vários mecanismos estão vinculados para explicar estas ações *in vivo*. Uma delas, seria que as lignanas inativa os radicais livres dos ácidos graxos e espécies reativas de oxigênio, como também possui efeito indireto *in vivo* nos sistemas antioxidantes endógenos, como na enzima glutatona (KINNIRY et al., 2006).

A capacidade em sequestrar o radical livre DPPH do óleo de linhaça marrom foi de 78,55% no estudo de Herchi e colegas (HERCHI et al., 2014), resultado semelhante ao

encontrado no presente trabalho (TABELA 3), evidenciando que a capacidade antioxidante do extrato de linhaça em sequestrar o radical DPPH foi de 74,55%. Isso pode ser explicado pela grande quantidade de ácidos graxos insaturados no óleo de linhaça e também pela presença dos compostos fenólicos contidos na linhaça (SIGER et al., 2008).

Relatos na literatura de que extratos vegetais contendo alto teor de antocianinas e outros flavonoides demonstraram alta atividade sequestradora de radicais quando analisados pelo método DPPH (IMRAN et al., 2010). Outros estudos elucidaram uma correlação positiva entre o elevado teor de flavonoides na amora-preta (*Morus nigra*) e sua capacidade de inibir a oxidação e radicais livres (WANG et al., 2010).

Hassimotto e colaboradores, também verificaram alta eficiência de inibição do radical DPPH pelas amoras (*Rubus eubatus*) de cultivares Tupy, Guarani e Brazos, extraídas com etanol 80%, conferindo uma capacidade antioxidante de 76, 71 e 66%, respectivamente (HASSIMOTTO et al., 2008), o que demonstra resultados semelhantes aos obtidos em nosso estudo com extrato de amoreira, como demonstrado na Tabela 3. A presença de uma antocianina majoritária na amora-preta, cianidina 3-glucosídeo, é citada por ser responsável pela alta atividade antioxidante nestas frutas (WANG et al., 2008). Além disso, o extrato butanólico de folhas de amora preta também apresentou atividade sequestrante do radical DPPH e inibiu a oxidação do LDL em humanos e coelhos (DOI; KOJIMA; FUJIMOTO, 2000).

Em um estudo com amora-silvestre (*Rubus fruticosus* L.) foi verificada uma notável capacidade antioxidante, em todos os ensaios realizados, com a seguinte ordem de potência antioxidante dos ensaios: ORAC > TEAC > DPPH > FRAP, sendo o teste de ORAC com maior potência e o de FRAP de menor, bem como uma forte capacidade de inibir a oxidação do ácido linolênico ( $72\% \pm 4,58$ ) em relação ao controle positivo (BHT,  $82\% \pm 2,04$ ). Assim, sugere-se que a amora-silvestre atua como um poderoso eliminador de vários radicais livres, com uma atividade antioxidante primária, que pode ser atribuída à capacidade redutora e antiperoxidativa, provavelmente devido principalmente aos grupos hidroxilas ligados à estruturas fenólicas e seu grau de glicosilação (MONFORTE et al., 2018).

#### **5.2.1.2 Beta-caroteno/ácido linoleico**

No atual estudo, outro ensaio utilizado, foi o sistema beta-caroteno/ácido linoleico, onde permite avaliar a capacidade de uma determinada substância em prevenir a oxidação do

$\beta$ -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (MARCO, 1968; MILLER, 1971).

Os percentuais de inibição da oxidação pelo sistema beta-caroteno/ácido linoleico para os extratos de linhaça tanto etéreo (-0,47 em 100  $\mu$ L e 2,52 em 200  $\mu$ L), quanto alcoólico (4,4 e 10,76 para 100 e 200  $\mu$ L, respectivamente) foram muito baixos, no estudo de Galvão e colaboradores. No entanto, apesar dos baixos percentuais, com a técnica de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) foi possível demonstrar a existência de compostos fenólicos antioxidantes nestes extratos, sendo assim, a atividade antioxidante não pôde ser potencialmente demonstrada no teste de beta-caroteno/ácido linoleico, devido às características intrínsecas da semente em relação ao meio em que está solubilizada (GALVÃO et al., 2008). Semelhantemente ao ocorrido no presente estudo, a atividade antioxidante do extrato de linhaça foi realizada pela quantificação pelo sistema beta-caroteno/ácido linoleico, entretanto os valores não puderam ser quantificados.

Porém, quando o extrato de amoreira foi submetido ao teste beta-caroteno/ácido linoleico, este revelou atividade inibitória da oxidação (44,77%), como demonstrado na Tabela 3. Hassimoto e colaboradores demonstraram que a oxidação do  $\beta$ -caroteno foi inibida em todas as cultivares de amora, perfazendo uma taxa de inibição que variou entre 66 a 76%. Estes valores são próximos aos obtidos pelo antioxidante sintético butil-hidroxitolueno (BHT) (inibição de 77,6% a 50  $\mu$ M), o que caracteriza as amoreiras como potentes antioxidantes, sendo que a cultivar Guarani apresentou maior capacidade antioxidante (inibição de  $76 \pm 3\%$ ) e teor de antocianina ( $194 \pm 5$  mg.100-1 FW) (HASSIMOTO et al., 2008).

Assim, nossos dados confirmam o alto poder antioxidante dos extratos de amoreira e linhaça utilizados neste estudo.

### **5.2.2 Fenólicos totais**

Estudo comparando diferente tipos de folhas secas de *Morus* (*Morus alba*, *Morus nigra* e *Morus rubra*), analisou o teor de fenólicos totais dessas plantas, onde houve variação dos valores de  $16,21 \pm 1,34$  (mg EAG/g) para *M. alba* a  $24,37 \pm 2,14$  (mg EAG/g) para *M. nigra*, demonstrando que as folhas de *Morus nigra* apresentaram maior teor de fenólicos totais (IQBAL et al., 2012). Segundo Ferreira e colaboradores, alto teor de compostos fenólicos totais foi encontrado na amora-preta e reportado por diversos autores para amoras de diferentes cultivares encontradas nos Estados Unidos, Brasil e Itália, com valores na faixa de

192,8 a 499,0 mg EAG/100g (BENVENUTI et al., 2004; HASSIMOTTO et al., 2008; SELLAPPAN et al., 2002; WANG et al., 2008; WANG; LIN, 2000).

Dependendo dos tipos de solventes utilizados para extração de amora-preta, pode-se ter um maior ou menor conteúdo de compostos fenólicos presentes. Foi observado que a acetona foi o solvente mais eficiente em extração em relação aos compostos fenólicos (1022±46 mg de EAG/100g), seguido de etanol (711±28 mg de EAG/100g) e metanol (672±58 mg de EAG/100g), que não diferiram entre si (VIZZOTTO; PEREIRA, 2011). Apesar de o presente estudo ter sido utilizado folhas, pecíolos e caules da amoreira, o teor de fenólicos totais do extrato etanólico de amoreira evidenciou um valor de 1482±37 mg de EAG/100g, semelhante ao observado no estudo anterior, quando a extração foi feita com acetona.

Quanto aos compostos fenólicos totais da linhaça, Velioglu et al. (1998) e Bozan e Temelli (2008) analisaram fenólicos totais em sementes de linhaça e reportaram, respectivamente, 509 e 1670mg de EAG/100g de semente (BOZAN; TEMELLI, 2008; VELIOGLU et al., 1998). Já no estudo de Barroso e colegas, os resultados entre as sementes de linhaça marrom (1332±0,09mg de EAG/100g) e dourada (1039±0,21mg de EAG/100g) não demonstraram diferença significativa entre elas. Possivelmente, esses resultados divergentes relacionam-se ao estágio de desenvolvimento da semente e/ou a diferenças no clima e solo, relacionadas à sua origem (BARROSO et al., 2013). Semelhante ao observado neste estudo, a extração da semente de linhaça marrom totalizou um valor de compostos fenólicos em 1395.4±11,8 mg de EAG/100g.

O valor de fenólicos totais do extrato da linhaça foi um pouco menor, comparado ao extrato da amoreira, possivelmente devido à menor eficiência da prensagem a frio na extração desses componentes da linhaça, em comparação à extração com solvente etanólico, ao extrair a amoreira, observando que o etanol foi o mais eficiente na extração, por este apresentar características moderadamente polares.

As altas concentrações de fenólicos totais encontrados nos extratos utilizados neste trabalho podem estar relacionadas diretamente com os resultados positivos observados nos animais ovariectomizados e suplementados com extratos de linhaça e/ou amoreira.

### **5.2.3 Peso corporal**

O estrógeno possui ação anorexígena, através de sua ação em núcleos hipotalâmicos, e

consequentemente, a redução do estrógeno circulante, promove maior ganho de peso, o que é observado em mulheres na menopausa ou em roedores ovariectomizados (OVX) (KAMEI et al., 2005). A administração de benzoato de  $17\beta$ -estradiol (EB) em animais OVX foi associada à diminuição na quantidade de alimentos ingeridos comparados aos animais OVX sem EB. Além disso, os animais sem EB tiveram aumento de seu peso corporal 25% a mais em relação aos animais EB (REBOUÇAS et al., 2016). Os nossos resultados corroboram com esses dados, no qual podemos observar um menor ganho de peso dos animais tratados com estrógeno em relação à salina.

No período pós-ovariectomia, o ganho ponderal pode estar relacionado com a redução do gasto energético e da ação anorexígena, devido à atenuação dos hormônios ovarianos, já que o estrógeno tem a capacidade de promover o aumento do metabolismo energético e ação anorexígena hipotalâmica, e assim diminuir o peso corporal (SZABO et al., 2003; SHARMA et al., 2017).

Molena-Fernandes e colaboradores demonstraram uma importante ação preventiva no desenvolvimento da obesidade, em ratos machos, alimentados com dietas suplementadas com farinha de linhaça. Segundo os autores, no grupo controle, o peso médio dos animais foi superior a 40% do peso dos animais suplementado com farinha de linhaça (MOLENA-FERNANDES et al., 2010). Em outro estudo de Gullo e colaboradores, a administração crônica da infusão de *Rubus rosifolius*, conhecida como amora silvestre, foi capaz de reduzir de forma significativa o Índice de Lee (ganho ponderal) dos animais, o que corresponderia ao IMC (índice de massa corporal) nos seres humanos (GULLO et al., 2015). Os dados do presente trabalho confirmam estes achados, uma vez que, o grupo tratado com salina teve maior ganho de peso em relação aos grupos tratados com extrato de linhaça, amoreira e composto, como demonstrado na Figura 2. Desta forma os animais suplementados com linhaça e amoreira apresentaram resultados semelhantes aos animais tratados com estrógeno em comparação com o grupo salina, apresentando menor ganho de peso.

#### **5.2.4 Análise comportamental**

Alterações comportamentais em fêmeas está comumente associado à flutuações de hormônios ovarianos. Diversos estudos estabeleceram uma ligação entre esses hormônios e a incidência de depressão e transtornos de ansiedade (WHARTON et al., 2012). Sugere-se que a maior prevalência desses distúrbios em mulheres podem estar relacionados à flutuações



hormonais, principalmente nas concentrações de estrógeno, particularmente caracterizando a transição para menopausa (WOODS et al., 2002). A administração de estrógeno (estradiol transdérmico), em mulheres no período de menopausa, provou ser bem eficaz no tratamento da depressão nessa população (SOARES, 2013).

Existe uma grande apreciação do papel da alimentação saudável na manutenção da saúde cerebral e comportamento, visando um bom funcionamento e melhora das capacidades cognitivas. Os fitoestrógenos podem ter efeitos genômicos e não genômicos via receptores de estrógenos no sistema nervoso central, podendo facilitar funções cerebrais como: atenção, função executiva e memória episódica (GREENDALE et al., 2013).

Wang e colaboradores observaram ação de secoisolariciresinol (SECO) isolado de sementes de linhaça como antidepressivo em camundongos OVX, submetidos ao teste de nado forçado e suspensão da cauda. Este estudo demonstrou que a suplementação de SECO apresentou resultados semelhantes ao grupo que recebeu o antidepressivo imipramina. O SECO também aumentou as concentrações de noradrenalina e dopamina no cérebro (WANG et al., 2013). Em outro estudo, animais que tiveram dieta suplementada com ômega-3, apresentaram redução nas concentrações de corticosterona, quando estes animais foram submetidos ao estresse por contenção, comparados com grupo controle, que não recebeu suplementação (FERRAZ et al., 2011). Animais submetidos ao protocolo de estresse apresentaram menor pico de corticosterona sustentado, atenuando efeitos prejudiciais do estresse crônico, quando foi ofertada uma dieta com semente de linhaça (HENNEBELLE et al., 2012).

Extratos de *Rubus brasiliensis Martius* (amora-branca), obtidos através de infusão e extrato etanólico, foram administrados em ratos Wistar machos e camundongos Swiss por via oral, nas doses de 50, 100 e 150 mg / kg, 30 min antes da avaliação comportamental no teste de labirinto em cruz elevado (LCE). Tanto a infusão quanto a fração etanólica na dose de 150 mg/kg, aumentaram o número e a porcentagem de entradas nos braços abertos dos animais, verificando que a *R. brasiliensis* apresentou efeito ansiolítico (NOGUEIRA et al., 1998). Entretanto, nossos resultados comportamentais não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados, em relação à permanência e entrada dos animais nos braços abertos quando submetidos ao LCE.

### 5.2.5 Lavado vaginal

As células do epitélio vaginal respondem com muita sensibilidade aos esteroides sexuais. Ações estrogênicas aumentam a atividade mitótica do epitélio colunar, induzindo proliferação, espessando assim, a mucosa vaginal. As células superficiais apresentam núcleo picnótico, queratinizam-se, tornando acidófilas e por fim, descamam (AIRES, 2018).

Existem alguns extratos de plantas que estão sendo muito utilizados para a redução dos sintomas da menopausa e que contêm elevadas concentrações de isoflavonas, um deles é *Angelica sinensis Diels*, onde o extrato de sua raiz foi administrado à ratas OVX durante 7 dias, na dose de 300 mg/kg, sendo possível observar modificação significativa no lavado vaginal em 67% das ratas tratadas, no qual o ciclo estral dos animais tratados foi caracterizado por estágio prolongado de estro (CIRCOSTA et al., 2006).

No trabalho de Occhiuto e colaboradores (2007), o extrato de *Trifolium pratense L.*, trevo vermelho rico em isoflavonas, foi administrado em ratas OVX em doses de 20 e 40 mg/dia, o que demonstrou um aumento significativo na diferenciação de células vaginais após 1 semana. Estas células exibiram um padrão distinto ao longo do tratamento do extrato de isoflavona, começando como uma população de leucócitos, avançando para os nucleócitos (meio do tratamento) e terminando com células cornificadas, dentro de 4 semanas. Já os animais do grupo controle OVX, a citologia vaginal era típica, causada por hipoestrogenismo, com células pequenas (leucócitos) e indiferenciadas (OCCHIUTO et al., 2007). O extrato etanólico de sementes de linhaça, promoveu alteração do epitélio vaginal de ratas imaturas ovariectomizadas através da observação do ciclo estral, tanto na dose de 500 mg/kg quanto na de 1000 mg/kg (ZAWAR et al., 2010).

Como observado nos lavados vaginais dos diferentes grupos do nosso estudo, verificamos que os animais tratados com salina demonstrou predomínio de células leucocitárias e pequenas, semelhantemente à fase de Diestro. Já nos animais tratados com estrógeno, foram observadas células epiteliais nucleadas e células queratinizadas, semelhantes às fases de proestro e estro. Da mesma forma, os animais tratados com extratos de linhaça, amoreira e composto, apresentaram células semelhantes aos animais tratados com estrógeno, demonstrando uma possível ação estrogênica no epitélio vaginal dos suplementos utilizados.

### 5.2.6 Peso Hipofisário

O estrógeno controla diversos aspectos biológicos na hipófise, incluindo a regulação

da homeostase dos lactotrófos, promovendo síntese e secreção de prolactina. Além disso, o estrógeno tem efeito trófico sobre a hipófise, principalmente na proliferação de lactotrófos, células de maior abundância na adeno-hipófise (KURS et al., 2014; RONCHETTI et al., 2013).

Em um estudo de Kurz e colaboradores foi observado o efeito da administração do estrógeno em uma linhagem de ratos, os quais tiveram os alelos *Ept7* bloqueados, na hipófise anterior. Esta alteração genética demonstrou capacidade de atenuar os efeitos do estrógeno endógeno e sintético (DES) no desenvolvimento de hiperplasia lactotrófica, em resposta ao tratamento, observando assim ações estrogênicas, via modulação da expressão gênica, na modulação do crescimento hipofisário (KURZ et al., 2014).

Como observado nos nossos resultados, houve um aumento significativo no peso das hipófises dos animais tratados com estrógeno, em relação aos animais tratados com salina, confirmando o efeito trófico do estrógeno sobre a hipófise. Além disso, os animais tratados com extratos de linhaça, amoreira e composto, também apresentaram aumento no peso das hipófises, semelhantes aos animais tratados com estrógenos, demonstrando assim, possível efeito estrogênico hipofisário dos suplementos administrado nestes animais.

## **5.2.7 Perfil metabólico**

### **5.2.7.1 Perfil lipídico**

A redução da ação estrogênica está relacionada com a elevação do risco de doenças cardiovasculares, bem como alterações do perfil lipídico (DERBY et al., 2009; KAYA et al., 2017). Uma vez que, o estrógeno age no fígado e aumenta a síntese de lipoproteína de alta densidade (HDL) e reduz a síntese da lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), dentre outras ações, promovendo assim um balanço benéfico no metabolismo dessas lipoproteínas e uma proteção cardiovascular (MENDELSON; KARAS, 1999a). Nossos resultados demonstram que animais sem ação estrogênica apresentam elevação do perfil lipídico em relação aos animais com ação estrogênica, como representado na Figura 6.

A linhaça recebeu grande destaque pelo seu potencial papel na prevenção de doenças cardiovasculares, principalmente quando usado como suplemento na dieta, em que demonstrou reduzir o colesterol total e LDL em estudos em humanos e animais (JENKINS et al., 1999). Cintra e colaboradores (2006), observaram os efeitos de truta, pele de frango, amendoim e da linhaça, administrados em ratos adultos, durante 28 dias. Eles demonstraram

que os animais alimentados com linhaça apresentaram redução nas concentrações plasmáticas de colesterol total e de LDL, bem como manutenção da integridade do tecido hepático, quando comparados com os demais grupos (CINTRA et al., 2006).

Segundo Morise e colaboradores, o elevado teor de ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA) presente no grão de linhaça poderia induzir a maior excreção de colesterol via secreção biliar, relacionando-se com importantes reduções nas concentrações de colesterol plasmático (MORISE et al., 2004). O principal mecanismo envolvido nestas reduções seria que o ALA, responsável por inibir a enzima 3-hidróxi-3metil-glutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase) que atua na síntese do colesterol. Além disso, a presença de fibras, tanto no grão quanto no farelo, promovem aumento no trânsito intestinal e conseqüentemente diminuição da absorção de lipídeos como colesterol, sendo também responsáveis pelas propriedades hipocolesterolêmicas desta oleaginosa (KATARE et al., 2012; KHALESI et al., 2011).

Benefícios estes, também já foram observados na amora, *Morus nigra L.*, que apresentou efeito hipocolesterolêmico significativo (MARQUES; TEIXEIRA, 2009). Extrato de *Morus nigra* causou redução nas concentrações de colesterol, triacilgliceróis e VLDL (VOLPATO et al., 2011). Estes efeitos de redução lipídica da amora (*Morus nigra*), pode ser explicado devido a esta planta possuir elevadas concentrações de flavonóides (PAWLOWSKA et al., 2008), semelhante aos terpenóides, no qual possuem ação hipolipemiante (JUNG et al., 2006).

No presente trabalho, a suplementação com os extratos de linhaça, amoreira e composto promoveu redução nas concentrações de colesterol total e LDL em relação ao grupo que recebeu salina. Isso pode ser devido às concentrações elevadas de ácidos graxos insaturados presentes na linhaça, os quais parecem exercer papel fundamental na melhoria do perfil lipídico, tanto em humanos quanto em animais, verificando efeito mais substancial na redução de LDL, considerada fator de risco cardiovascular (MORISE et al., 2004; OOHMAN, 2001). Além disso, animais que receberam extrato de *Rubi Fructus* (amora) apresentaram redução dos lipídios plasmáticos (TAG, colesterol total e LDL), sendo que este efeito parece estar associado à supressão da atividade da enzima lipogênica e aceleração da oxidação de ácidos graxos em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica (NAM et al., 2014).

Após a suplementação dietética de *Rubus coreanus Miquel* (RCM), conhecida como amora coreana, as concentrações plasmáticas de HDL aumentaram, enquanto que a

concentração de colesterol total diminuiu (CHAE et al., 2014), semelhantemente ao observado no presente estudo apresentando redução efetiva das concentrações de colesterol total, quando os animais receberam extratos de amoreira e composto. Os polifenóis presentes na amora coreana exerceram efeitos benéficos sobre o perfil lipídico e foram relatados como protetores contra doenças cardiovasculares (MATSUMOTO et al., 1998).

A linhaça pode retardar a progressão da formação de lesão aterosclerótica, no entanto, não se sabe se pode reverter quando já ocorreu a formação. Campbell et al. (2013) induziram lesão aterosclerótica em fêmeas (OVX) de hamsters, com uma dieta contendo linhaça, a regressão da lesão no arco aórtico foi verificada histologicamente e também foi possível observar redução de apolipoproteína A (Apo A) e Apo B, porém não foi observada alterações no colesterol total, TAG, HDL e LDL (CAMPBELL et al., 2013). O presente trabalho mostrou um efeito preventivo no aumento do colesterol total, LDL e TAG, promovido pela ovariectomia, dos animais tratados com os extratos de linhaça e amoreira, mas não alterou HDL, como observado na Figura 6, da mesma forma como demonstrado no trabalho de Campbell e colaboradores, resultados estes suportam a eficácia da linhaça na redução do risco de doença cardiovascular (CAMPBELL et al., 2013).

Sugere-se que a suplementação de semente de linhaça melhora o perfil das relações entre colesterol total e frações, porém quando administrada junto à dieta hipercolesterolemiantes a semente não conferiu tal efeito (MELO et al., 2008).

O processo de digestão dos lipídeos implica em uma série de etapas, sendo uma delas a hidrólise por enzimas lipolíticas, incluindo a lipase pancreática (LP), que opera na interface óleo-água, juntamente com a colipase. A natureza dos lipídios, presentes nessa interface, modula a atividade enzimática. De fato, estudos baseados na digestão *in vitro* de lipídios emulsionados revestidos com vários emulsificadores, mostraram que a LP facilitou o acesso às gorduras emulsionadas em comparação com outros surfactantes não-iônicos (MUN et al., 2007; SINGH; HORNE, 2009).

A lipase pancreática secretada no intestino delgado é responsável por transformar lipídios em monoacilgliceróis e ácidos graxos livres, transformando-os assim em produtos facilmente absorvidos pela mucosa intestinal (HEO et al., 2009; LEE et al., 2001).

Estudo de Hamden e colaboradores avaliou os efeitos do  $17\beta$ -estradiol na secreção de insulina pancreática e nos perfis de atividade da lipase em ratos diabéticos. A administração

de estrógeno nos ratos diabéticos demonstrou concentrações reduzidas na absorção de glicose e reduziu a atividade da lipase plasmática em 84%, provocando uma diminuição considerável de 28% e 71% nas concentrações de colesterol total e TAG no plasma, respectivamente (HAMDEN et al., 2011). Da mesma forma, foi observado nos resultados obtidos do presente trabalho, redução da lipase plasmática nos animais tratados com estrógeno. Além disso, nossos resultados demonstram os efeitos dos extratos de linhaça, amoreira e composto na redução da lipase plasmática, semelhantemente, aos resultados obtidos nos animais com ação estrogênica, como representado na Figura 6. Podendo assim sugerir, que os extratos oferecidos aos animais, promoveram ação inibidora e/ou redução da lipase pancreática. Com isso, há limitação da absorção intestinal de lipídios, o que pode ter auxiliado na redução do perfil lipídico comparado com os animais tratados com salina, observado nos nossos resultados. Portanto, esses extratos podem ser considerados fortes candidatos no tratamento e prevenção de hiperlipidemias, obesidade e doenças cardiovasculares.

#### **5.2.7.2 Ácido Úrico**

Muitos achados na literatura sugerem que valores elevados de ácido úrico plasmático possa aumentar o risco de doenças cardiovasculares (KIRILMAZ et al., 2010; MORIARITY et al., 2000; NIETO et al. 2000). Um dos primeiros relatórios mostrando um efeito hipouricêmico da linhaça dietética foi feito por Bhatena e colaboradores, no qual, eles obtiveram redução do ácido úrico no plasma com farinha de linhaça, tanto em ratos F344 (concentrações lipídicas normais) quanto em SHR/N-cp (obesos) (BHATHENA et al., 2002). Ratos que receberam 20% do extrato de linhaça apresentaram diminuição na concentração plasmática de ácido úrico (TOMAZ PACHECO et al., 2011).

Já a administração por 30 dias de chá das folhas de *Morus nigra* não teve influência sobre a concentração de ácido úrico (OLIVEIRA et al., 2013). Da mesma forma, nossos resultados não apresentaram diferença na concentração plasmática de ácido úrico entre os diferentes grupos analisados.

#### **5.2.7.3 TGO e TGP**

Na presença de necrose hepática e destruição tecidual por agentes tóxicos, as transaminases hepáticas (TGO e TGP) são liberadas no sangue e se encontram em altas concentrações (GIANNINI et al., 2005). Chae e colaboradores, demonstraram que as atividades de TGO, TGP e fosfatase alcalina (ALP) estavam aumentadas no animais, pela

exposição ao Tetracloreto de Carbono (CCl<sub>4</sub>), e foram reduzidas com a administração de *Rubus coreanus Miquel* (RCM), demonstrando que a amora possa desempenhar um papel importante nos efeitos protetores contra a lesão induzida por CCl<sub>4</sub> (CHAE et al., 2014).

Utilizando aves adultas em idade avançada, que apresentavam esteatose e lesão hepatocelular, Davis e colaboradores observaram que estas lesões foram parcialmente atenuadas com suplementação de linhaça. Em particular, galinhas alimentadas com dietas contendo semente de linhaça, exibiram maior proteção contra a esteatose hepática não alcoólica. Mais especificamente, as galinhas poedeiras suplementadas tanto com semente de linhaça quanto com farinha de linhaça desengordurada (DFM) melhoraram os parâmetros morfológicos do fígado e concentrações séricas de TGO. Em conjunto, estes dados indicam uma relação potencial sinérgica entre o conteúdo de ácidos graxos e lignana na linhaça, que atenuam a progressão da esteatose hepática não alcoólica (DAVIS et al., 2016).

A administração subcrônica em ratos, durante o período de 30 dias, com chá das folhas de *Morus nigra*, foi considerado de baixa toxicidade, pois não produziu mortes, nem sinais de toxicidade aos animais. Além disso, este tratamento não gerou alterações nas concentrações plasmáticas de TGO e TGP (OLIVEIRA et al., 2013). Nossos resultados também demonstram que, as concentrações de TGO e TGP, não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados e mantiveram as concentrações dentro da normalidade, sugerindo que a suplementação com os extratos de linhaça e amoreira possivelmente não demonstra toxicidade para os hepatócitos.

### **5.2.8 Histomorfometria do útero**

Alterações importantes causadas nesse órgão são devidas as ações estrogênicas no endométrio e no útero como um todo. O estrógeno aumenta a síntese proteica, musculatura uterina e a proliferação das células do estroma e epiteliais. Outra ação estrogênica é o desenvolvimento de glândulas endometriais e novos vasos sanguíneos, além de retenção de líquido e eletrólitos, tornando o órgão edemaciado, e o endométrio cada vez mais espesso (AIRES, 2018). No presente estudo, o grupo tratado com estrógeno apresentou maior espessura endometrial, devido ação estrogênica no órgão.

Os fitoestrógenos são reconhecidos há muito tempo por sua atividade uterotrófica em uma variedade de espécies animais. Um efeito potencial estrogênico, em relação ao peso do útero, foi constatado em camundongos OVX, tratados durante 25 semanas com combinação

de proteína isolada de soja e linhaça, resultando em aumento do peso uterino comparado ao controle (dieta basal), enquanto que o grupo tratado somente com soja produziu efeito intermediário (POWER et al., 2007).

Dilshad e colaboradores (2012) verificaram aumento significativo no peso uterino e peso ovariano de camundongos que receberam extrato aquoso metanólico de sementes de linhaça nas concentrações de 200 ou 300 mg/kg de peso corporal durante 25 dias. Esses aumentos no peso do útero e do ovário foram atribuídos à possíveis atividades fito-estrogênicas presente nas sementes de linho (DILSHAD et al., 2012).

O extrato etanólico de sementes de linhaça, tanto na dose de 500 mg/kg quanto na de 1000 mg/kg, em ratas imaturas sexualmente e não ovariectomizadas, demonstrou aumento do peso uterino (ZAWAR et al., 2010). Os resultados do presente trabalho demonstra que os animais tratados com extratos de linhaça e composto apresentaram aumento da espessura do endométrio, em relação aos animais tratados com salina, os quais tiveram atrofia uterina devido à ausência de ação estrogênica causada pela retirada dos ovários, como demonstrado na Figura 10.

A Figura 10 também demonstra aumento da espessura do endométrio nos animais que receberam os extratos de amoreira em comparação a salina. Dados da literatura demonstram crescimento uterino em animais tratados com dose de 500 mg/kg de extrato metanólico de *Morus alba* (NANDINI et al., 2010). A administração do extrato de *Angelica sinensis Diels*, fonte de isoflavonas, também estimulou a histoarquitetura do útero, aumentando consideravelmente a espessura do endométrio, bem como o desenvolvimento das glândulas uterinas (CIRCOSTA et al., 2006). Provavelmente, os extratos de linhaça e amoreira estariam interagindo com receptores  $\alpha$  estrogênicos, resultando assim, no aumento observado no endométrio.

Dose dietética de genisteína de 375  $\mu\text{g/g}$ , ofertada a animais OXV, promoveu aumento do peso uterino quando comparado com animais sem esta suplementação, da mesma forma sugerindo que a genisteína possa atuar no útero de maneira similar à do estradiol, se ligando aos receptores para estrógeno, desencadeando expressão de genes responsivos ao estrogênio que, em última análise, resultam em aumento da massa uterina (SANTELL et al., 1997).

Porém, outros trabalhos não demonstraram diferenças no ganho de peso uterino (peso úmido), no tamanho das células epiteliais uterinas e nenhuma alteração no número de



glândulas uterinas, em ratas Sprague-Dawley alimentadas com uma dieta à base de soja e alfafa (NACIFF et al., 2004).

### 5.2.9 Histomorfometria óssea

O déficit de estrogênio durante a menopausa também pode afetar a saúde óssea. A ovariectomia, com conseqüente redução do estrógeno, na maioria dos casos, promove aumento na remodelação óssea (reabsorção excedendo à formação) associada à perda de massa óssea em vários locais, principalmente em osso trabecular, levando a diminuição na densidade óssea, mineralização e força. Assim, nas mulheres, a perda óssea como conseqüência da menopausa, está associada a altas concentrações de marcadores bioquímicos de renovação óssea, como a fosfatase alcalina (OCCHIUTO et al., 2007). Os dados do presente estudo confirmam a ação protetora do estrógeno sobre a modelação óssea, prevenindo a reabsorção óssea, como representando na Figura 13.

Componentes na linhaça, como o ácido  $\alpha$ -linolênico, podem, pelo menos em partes, serem responsáveis por efeitos benéficos, como a estabilidade da formação óssea (POWER et al., 2007). Diversos estudos constataram que os ácidos graxos poli-insaturados  $\Omega$ -3 induzem efeitos nos ossos, inibindo a síntese da prostaglandina E<sub>2</sub>, eicosanóide de reabsorção óssea (WATKINS et al., 2005; FERNANDES et al., 2003) e diminuindo as citocinas pró-inflamatórias (COHEN; WARD, 2005), fatores estes que causam aumento da reabsorção óssea.

Alguns efeitos benéficos nos parâmetros de força biomecânica do fêmur foram observados, após animais OVX serem alimentados com linhaça, produzindo maior rigidez ao fêmur colocado sob carga, em comparação ao controle. Isso pode indicar uma alteração induzida pela linhaça no osso, havendo uma redução no risco de fraturas ósseas (POWER et al., 2007), situação comum em mulheres pós menopausa.

Após administração do extrato do fruto de *Rubus coreanus* (RCM), foi observado uma prevenção da perda óssea induzida pela OVX e redução na adiposidade da medula, sendo que, o grupo que recebeu 400 mg/kg de RCM, durante 10 semanas, tiveram a dimensão óssea trabecular do fêmur mantida em mais de 35% em comparação aos animais OVX que receberam salina. Assim, sugere-se que o efeito protetor ósseo de RCM seja mediado, pelo menos em parte, estimulando a diferenciação e maturação dos osteoblastos, bem como indução da apoptose de osteoclastos (DO et al., 2008). Da mesma forma, nossos resultados

demonstraram efeito protetor ósseo com a suplementação de extrato de amoreira em animais sem ação estrogênica.

Em exame microscópico do osso do fêmur, ratas OVX apresentaram trabéculas escassas, com tendência à ruptura e presença de células adiposas, no entanto, animais OVX que foram alimentados com 10% de óleo de linhaça e de gergelim apresentaram trabéculas alongadas, presença de conectividade e com menos rupturas (BOULBAROUD et al., 2008). Os benefícios desses óleos na dieta foram observados no experimento de Boulbaroud e colegas, melhorando o estado ósseo, semelhante ao verificado no presente estudo, ou seja, a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFAs) pode auxiliar na prevenção da osteoporose associada à deficiência de estrógeno.

Assim os dados do presente trabalho corroboram com dados da literatura, e sugerem que a suplementação com extratos de linhaça e/ou amoreira podem prevenir a perda óssea causada pela falta de ação estrogênica, como demonstrado na Figura 13.

#### **5.2.10 Análise Histopatológica**

O óleo de linhaça é rico em ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFAs  $\Omega$ -3), principalmente ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA, 18: 3 n-3). Estudos clínicos relataram que baixas concentrações de PUFAs  $\Omega$ -3 no tecido sérico e hepático são uma das características comuns em pacientes com esteatose hepática alcoólica (SHAPIRO et al., 2011). A administração de óleo de linhaça, preveniu esteatose hepática alcoólica aguda, via melhora da homeostase lipídica no eixo do fígado-tecido adiposo em camundongos (WANG et al., 2016).

Zhang e colaboradores (2017) encontraram concentrações plasmáticas anormais de TGO e TGP, no grupo com alimentação à base de álcool e óleo de milho, indicando lesão hepática induzida pelo álcool. No entanto, reduções significativas de TGO e TGP, bem como, melhora da lesão hepática, foram verificadas no grupo suplementado com óleo de linhaça e álcool, indicando efeito protetor ao dano hepático causado pela alimentação crônica com etanol (ZHANG et al., 2017).

Danos ao fígado por CCl<sub>4</sub> foram melhorados pela suplementação com amora coreana, onde sua atividade hepatoprotetora foi demonstrada através do seu efeito anti-inflamatório, onde foi observado aumento da atividade hepática da enzima superóxido dismutase (SOD). Sendo assim, a amora coreana foi capaz de melhorar a integridade da célula hepática, podendo ser considerada hepatoprotetora, por atuar na melhora da função hepática e restaurar

as atividades de TGO, TGP e fosfatase alcalina (ALP) (CHAE et al., 2014). Além disso, *Morus nigra* não exerceu efeito tóxico sobre o sistema reprodutor feminino ou sobre o desenvolvimento embrionário de ratos, contribuindo para redução na incidência de anormalidades nos filhos de mães diabéticas (VOLPATO et al. 2011, QUEIROZ et al., 2012).

Oliveira e colaboradores (2013) observaram que extrato aquoso de folhas de *Morus nigra* apresentou baixa toxicidade após tratamento por via oral, durante 30 dias, em ratos (OLIVEIRA et al., 2013). Vijaimohan e colaboradores (2006) observaram que ratos recebendo óleo de linhaça via oral (1g/kg peso) por 60 dias, também não evidenciaram alterações histológicas no tecido hepático, com reduzida deposição de gordura nos hepatócitos (VIJAIMOHAN et al., 2006). Além disso, a presença do ALA na linhaça reduz o acúmulo hepático de lipídios, por estimular a  $\beta$ -oxidação, inibindo a síntese de ácidos graxos e de triacilgliceróis (CINTRA et al., 2006). Resultado semelhante foi observado no nosso estudo, onde animais que receberam os extratos de linhaça e/ou amoreira não apresentaram danos ao fígado e tiveram um menor depósito de gorduras nos hepatócitos, os quais foram observados nos animais tratados com salina.

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados do presente trabalho sugerem que a suplementação com os extratos de linhaça e/ou amoreira promoveu efeitos benéficos nos diferentes tecidos e sistemas do organismo sem ação estrogênica, semelhantes aos encontrados nos animais estrogenizados, sem demonstrar toxicidade ao organismo. Sendo assim, pode-se prever uma alternativa e/ou complemento eficaz para reduzir o uso de hormônios sintéticos e controlar os efeitos gerados pela diminuição da ação estrogênica.

## REFERÊNCIAS

- AGAN, K.; OZMERDIVENLI, R.; DE € GIRMENCI, Y., et al. Evaluation of sleep in women with menopause: results of the Pittsburg Sleep Quality Index and polysomnography. **Journal of the Turkish-German Gynecological Association**, v. 16, p. 149–152, 2015.
- AIRES, M. M. **Fisiologia**. 5 ed., Guanabara: KOOGAN, 1392, p., 2018.
- ALMEIDA, J. R. G. D. S.; GUIMARÃES, A. L.; DE OLIVEIRA, A. P., et al., “Evaluation of hypoglycemic potential and pre-clinical toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae),” **Latin American Journal of Pharmacy**, vol. 30, no. 1, pp. 96–100, 2011.
- ALONSO, J. **Tratado de fitofármacos y nutraceuticos**. Rosario (Argentina): Corpus Libros, p.1052-1055, 2004.
- ALVARADO-GARCÍA, A.; HERNÁNDEZ-QUIJANO, T.; HERNÁNDEZ-VALENCIA, M.; NEGRÍN-PÉREZ, M.C.; RÍOS-CASTILLO, B.; VALENCIA-PÉREZ, G.U.; VITAL-REYES, V.S.; BASAVILVAZO-RODRÍGUEZ, M.A.; TORRES-ARREOLA, L.P.; ORTIZ-LUNA, G.F.; SÁNCHEZ-AGUIRRE, F.; MONTAÑO-USCANGA, A. Clinical practice guideline. Diagnosis and treatment of postmenopausal and perimenopausia. **Revista Medica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social**, v.53, n.2, p.214-25, 2015.
- ALVES, C.Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, 2010.
- AMER, D.A.; JÄHNE, M.; WEIGT, C.; KRETZSCHMAR, G.; VOLLMER, G. Effect of 17 $\beta$ -estradiol and flavonoids on the regulation of expression of newly identified estrogen responsive genes in a rat raphe nuclei-derived cell line. **Journal of Cellular Physiology**, p.29, 2011.
- AMIN, I.; NORAZAIDAH, Y.; HAINIDA, K. I. E. Antioxidant activity and phenolic content of raw and blanched *Amaranthus* species. **Food Chemistry**, Barking, v. 94, n. 1, p.47-52, 2006.
- AYERS, D.C.; LOIKE, J.U. Lignans: Chemical, Biological, and Clinical Properties. **Cambridge: Cambridge University Press**, 1990.
- BACCARO, L.F.; CONDE, D.M.; COSTA-PAIVA, L.; PINTO-NETO, A.M. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. **Clinical Intervention in Aging**, v. 20, n.10, p. 583-591, 2015.
- BAE, G. U.; SEO, D. W.; KWON, H. K.; LEE, H. Y.; HONG, S.; LEE, Z. W.; HA, K. S.; LEE, H. W.; HAN, J. W. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, 32596, 1999.
- BARROSO, A. K. M.; TORRES, A. G.; CASTELO-BRANCO, V. N.; FERREIRA, A.; FINOTELLI, P. V.; FREITAS, S. P.; ROCHA-LEÃO, M. H. M. Linhaça marrom e dourada: propriedades químicas e funcionais das sementes e dos óleos prensados a frio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.1, p.181-187, 2014.

- BEDOSSA, P.; POITOU, C.; VEYRIE, N.; BOUILLOT, J.L.; BASDEVANT, A.; PARADIS, V.; TORDJMAN, J.; CLEMENT, K. Histopathological algorithm and scoring system for evaluation of liver lesions in morbidly obese patients. **Hepatology**, v. 56, n. 5, p. 1751-1759, 2012.
- BHATHENA, S.J.; ALI, A.A.; MOHAMED, A.I.; HANSEN, C.T.; VELASQUEZ, M.T. Differential effects of dietary flaxseed protein and soy protein on plasma triglyceride and uric acid levels in animal models. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 11, p. 684-689, 2002.
- BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. **Clinical Science**, v. 98, n. 2, p. 217-40, 2000.
- BOKOV, A. F.; KO, D.; RICHARDSON, A. The effect of gonadectomy and estradiol on sensitivity to oxidative stress. **Endocrinology Research**. v. 34, n. 1-2, p. 43–58, 2009.
- BOLZAN, Viviane Cordeiro. **Efeito do extrato das folhas da *Morus nigra* sobre a citologia vaginal e níveis plasmáticos de hormônios sexuais femininos em ratas wistar**. 2008. Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Fundação Universidade Federal Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2008.
- BOULBAROUD, S.; MESFIOUI, A.; ARFAOUI, A.; OUICHOU, A.; EL-HESSNI, A. Preventive effects of flaxseed and sesame oil on bone loss in ovariectomized rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 13, 1696-701, 2008.
- BOZAN, B.; TEMELLI, F. Chemical composition and oxidative stability of fax, safflower and poppy seed and seed oils. **Bioresource of Technology**, v.99, n.14, 6354-6359, 2008.
- BRADY, C. W. Liver disease in menopause. **World Journal of Gastroenterology**, v. 21, n. 25, p. 7613-20, 2015.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LEBENSM-WISS. Technol.**, v. 28, p. 25, 1995.
- BRANDT, N.; VIERK, R.; RUNE, G. M. Sexual dimorphism in estrogen-induced synaptogenesis in the adult hippocampus. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 57, n. 5, p. 351-356, 2013.
- BROMBERGER, J.T.; MATTHEWS, K.A.; SCHOTT, L.L., et al. Depressive symptoms during the menopausal transition: the Study of Women’s Health Across the Nation (SWAN) **Journal of Affective Disorders**, v. 103, p. 267–272, 2007.
- CAMPBELL, S. C.; BAKHSHALIAN, N.; SADAAT, R. L.; LERNER, M. R.; LIGHTFOOT, S. A.; BRACKETT, D.; ARJMANDI, B. H. Flaxseed reverses atherosclerotic lesion formation and lowers lipoprotein(a) in ovarian hormone deficiency. **Menopause**, v. 20, n. 11, p. 1176-1183, 2013.
- CAMPOS, A.C.; GUIMARÃES, F.S. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. **Psychopharmacology**, v. 199, n. 2, p. 223-30, 2008.

CARVALHO, P. G. B., et al. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultural Science**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 397-404, Oct., 2006.

CASTAÑEDA-OVANDO; A. et al. C. A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, v. 113, p. 859 – 871, 2009.

CESAR, I. C., et al. Determinação de daidzeína, genisteína e gliciteína em cápsulas de isoflavonas por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 616-625, 2007.

CHAE, H. J.; YIM, J. E.; KIM, K. A.; CHYUN, J. H. Hepatoprotective effects of *Rubus coreanus* miquel concentrates on liver injuries induced by carbon tetrachloride in rats. **Nutrition Research and Practice**, v. 8, n. 1, p. 40-45, 2014.

CHANG, C.L.; WU, C.H.; YAO, W.J., et al. Relationships of age, menopause and central obesity on cardiovascular disease risk factors in Chinese women. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, v. 24, p. 1699–1704, 2000.

CHIANG, S.S.; PAN, T.M. Beneficial effects of phytoestrogens and their metabolites produced by intestinal microflora on bone health. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 4, p.1489-1500, 2013.

CHOI, Y.; CHANG, Y.; KIM, B.K., et al. Menopausal stages and serum lipid and lipoprotein abnormalities in middleaged women. **Maturitas**, v. 80, p. 399–405, 2015.

CINTRA, D.E.; COSTA, A.V.; PELUZIO, MDO. C.; MATTA, S.L.; SILVA, M.T.; COSTA, N.M. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. **Nutrition**. v. 22, n. 2, p. 197-205, 2006.

CIRCOSTA, C.; PASQUALE, R.D.; PALUMBO, D.R.; SAMPERI, S.; OCCHIUTO, F. Estrogenic activity of standardized extract of *Angelica sinensis*. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 8, p. 665-9, 2006.

CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R.M.R.; JULIÃO, M., et al. Fitoestrogênios: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n 6, 2002.

COHEN, S. L.; WARD, W. E. Flaxseed oil and bone development in growing male and female mice. **Journal Toxicology Environmental Health part A**, v. 68, p. 1861–1870, 2005.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. Alimentos funcionais – compostos bioativos e efeitos fisiológicos. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 504p. 2016.

DAVIS, J.E.; CAIN, J.; SMALL, C.; HALES, D.B. Therapeutic effect of flax-based diets on fatty liver in aged laying hens. **Poultry Science**, v. 95, n. 11, p. 2624-2632, 2016.

DEL BIANCO-BORGES, B.; CABRAL, F.J.; FRANCI, C.R. Co-expression of leptin and oestrogen receptors in the preoptic-hypothalamic area. **Journal of Neuroendocrinology**, v.22, p.996-1003, 2010.

DERBY, C.A.; CRAWFORD, S.L.; PASTERNAK, R.C., et al. Lipid changes during the menopause transition in relation to age and weight: the Study of Women's Health Across the Nation. **American Journal Epidemiology**, v. 169, p. 1352–1361, 2009.

DESPAIGNE, D. A. Fitoestrógenos y su utilidad para el tratamiento del síndrome climatérico. **Revista Cubana de Endocrinología**, v.12, n.2, 2001.

DILSHAD, S. M. R.; REHMAN, N. U.; AHMAD, N.; IQBAL, A.; ALI, M. A.; AHMAD, A. Effect of flax seeds (*Linum usitatissimum*) on uterine and ovarian protein contents, ovarian cholesterol, serum Estradiol and onset of puberty in immature female mice. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.14, n. 5, p.781-786, 2012.

DJERASSI, C. Steroid research at Syntex: the Pill and cortisone. **Steroids**, v.57, p.631–64, 1992.

DO, S.H.; LEE, J.W.; JEONG, W.I.; CHUNG, J.Y.; PARK, S.J.; HONG, I.H.; JEON, S.K.; LEE, I.S.; JEONG, K.S. Bone-protecting effect of *Rubus coreanus* by dual regulation of osteoblasts and osteoclasts. **Menopause**, v. 15, (4 Pt 1), p. 676-83, 2008.

DOI, K.; KOJIMA, T.; FUJIMOTO, Y. Mulberry leaf extract inhibits oxidative modification of rabbit and human low-density lipoprotein. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, p. 1066-1071, 2000.

DUDAS, B.; MERCHENTHALER, I. Three-dimensional representation of the neurotransmitter systems of the human hypothalamus: inputs of the gonadotrophin hormone-releasing hormone neuronal system. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, n. 2, p. 79-95, 2006.

FARMAKALIDIS, E., MURPHY, P. A. J. Isolation of 600-O-acetylgenistein and 6-O-acetylaidzein from toasted defatted soy flakes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 33, p. 385, 1985.

FERLAY, J.; BRAY, F.; PISANI, P. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. **IARC Cancer Base** no. 5. Lyon: IARC Press, 2004.

FERNANDES, G.; LAWRENCE, R.; SUN, D. Protective role of n-3 lipids and soy protein in osteoporosis. **Prostaglandins Leukotrienes Essential Fatty Acids**, v. 68, p. 361–372, 2003.

FERRAZ, A.C.; DELATTRE, A.M.; ALMENDRA, R.G.; SONAGLI, M.; BORGES C.; ARAUJO, P., et al. Chronic n-3 fatty acids supplementation promotes beneficial effects on anxiety, cognitive and depressive-like behaviors in rats subjected to a restraint stress protocol. **Behavior Brain Research**, v. 219, p. 116-122, 2011.

FERREIRA, D. S.; ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. COMPOSTOS BIOATIVOS PRESENTES EM AMORA-PRETA (*Rubus* spp.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 32, n. 3, p. 664-674, Setembro 2010.

FIGUEIREDO, C. A. a. **Fitoterapia**. João Pessoa, NEPHF: 2007.

FINK, G. The endocrine control of ovulation. **Science progress**, v. 70, (279 Pt 3) p. 403-

423, 1986.

FRANZOTTI, Elaine Maria. **Identificação de agonistas e antagonistas de receptores nucleares em extratos de plantas medicinais: Morus nigra L., Plectranthus ornatus Codd., Ipomea cairica (L) sweet e Pouteria torta (Mart.) radlk.** 2006. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade de Brasília, 2006.

FREITAS, M.M. et al. Extracts of Morus nigra L. leaves standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: tyrosinase inhibition and cytotoxicity. **PLoS ONE**, v. 11, p. 1-24, 2016.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 178-182, 2005.

GALLO, R.V. Pulsatile LH release during periods of low level LH secretion in the rat estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 24, n. 4, p. 771-777, 1981.

GALVÃO, E. L.; SILVA, D. C. F.; SILVA, J. O.; MOREIRA, A. V. B.; SOUSA, E. M. B. D. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça, **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.28, n. 3, 2008.

GANORKAR, P. M.; JAIN, R. K. Flaxseed – A nutritional punch. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 2, p. 519-525, 2013.

GANRY, O. Phytoestrogen and breast cancer prevention. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 11, p. 519-22, 2002.

GIANNINI, E. G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **CMAJ**, v. 172, p. 367-379, 2005.

GLAZIER, M.G.; BOWMAM, M.A. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for tradicional estrogen replacement therapy. **Archives of Internal Medicine**, v. 161, n. 9, p. 1161-1172, Dec., 2001.

GOETTEMS-FIORIN, P.B.; COSTA-BEBER, L.C.; DOS SANTOS, J.B.; FRISKE, P.T.; SULZBACHER, L.M.; FRIZZO, M.N.; LUDWIG, M.S.; RHODEN, C.R.; HECK, T.G. Ovariectomy predisposes female rats to fine particulate matter exposure's effects by altering metabolic, oxidative, pro-inflammatory, and heat-shock protein levels. **Environmental Science and Pollution Research**, 2019.

GORRITI, A.; ARROYO, J.; QUISPE, F.; CISNEROS, B.; CONDORHUAMÁN, M.; ALMORA, Y.; CHUMPITAZ, V. Oral toxicity at 60-days of sacha inchi oil (*Plukenetia volubilis* L.) and linseed (*Linum usitatissimum* L.), and determination of lethal dose 50 in rodents. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v. 27, n. 3, p. 352-60, 2010.

GRADY, D.; APPLGATE, W.; BUSH, T.; FURBERG, C.; RIGGS, B.; HULLEY, S.B. Heart and Estrogen/progestatin Replacement Study (HERS): design, methods, and baseline characteristics. **Controlled Clinical Trials**, v.19, n. 4, 1998.



- GREENDALE, G. A.; HUANG, M-H.; LEUNG, K.; CRAWFORD, S. L.; GOLD, E. B.; WIGHT, R.; WAETJEN, R.; KARLAMANGLA, A. S. Dietary Phytoestrogen Intakes and Cognitive Function During the Menopause Transition: Results from the SWAN Phytoestrogen Study. **Menopause**, v. 19, n. 8, p. 894–903, 2013.
- GUIMARÃES, F. S.; CHIARETTI, T. M.; GRAEFF, F. G.; ZUARDI, A. W. Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze. **Psychopharmacology**, v. 100, p. 558-559 1990.
- GULLO, G. I.; CARVALHO, C. W.; FERREIRA, G. Efeito da Administração Crônica de Extrato Aquoso de *Rubus rosifolius* sobre o Perfil Glicêmico e Ponderal de Ratos Induzidos ao Diabetes e Obesidade. **Revista Ciências em Saúde**, v. 5, n. 1, jan-mar, 2015.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E.; J. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, p. 598, 1992.
- HAMDEN, K.; JAOUADI, B.; ZARAÏ, N.; REBAI, T.; CARREAU, S.; ELFEKI, A. Inhibitory effects of estrogens on digestive enzymes, insulin deficiency, and pancreas toxicity in diabetic rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 67, n.1, p. 121-128, 2011.
- HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, I. S.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and comercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 2928–2935, 2005.
- HASSIMOTTO, N.M.A.; MOTA, R. V.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Physicochemical characterization and bioactive compounds of blackberry fruits (*Rubus* spp.) grown in Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.3, p.702-708, 2008.
- HENNEBELLE, M.; BALASSE, L.; LATOUR, A.; CHAMPEIL-POTOKAR, G.; DENIS, S.; LAVIALLE, M.; GISQUET-VERRIER, P.; DENIS, I.; VANCASSEL, S. Influence of ômega-3 fatty acids status on the way rats adapt to chronic restraint stress. **PLoS One**, v. 7, n. 7, e42142, 2012.
- HEO, S.J.; HWANG, J.Y.; CHOI, J.I.; HAN, J.S.; KIM, H.J.; JEON, Y.J. Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, brown algae, a potent  $\alpha$ -glucosidase and  $\alpha$ -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. **European Journal Pharmacology**, v. 615, n. 1-3, p. 252-6, 2009.
- HERBISON, A.E. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrine Reviews**, v. 19, n. 3, p. 302-330, 1998.
- HERCHI, W.; AL HUJAILI, A. D.; SAKOUHI, F.; SEBEI, K.; TRABELSI, H.; KALLEL, H.; BOUKHCHINA, S. Flaxseed hull: Chemical composition and antioxidant activity during development. **Journal of Oleo Science**, v. 63, n. 7, p. 681-689, 2014.
- HERNANDEZ, I.; DELGADO, J.L.; DIAZ, J.; QUESADA, T.; TERUEL, M.J.; LLANOS, M.C.; CARBONELL, L.F. 17- b-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**. v. 279, n. 5, p. R1599-605, 2000.

HILL, J.W.; URBAN, J.H.; XU, M.; LEVINE, J.E. Estrogen Induces Neuropeptide Y (NPY) Y1 receptor gene expression and responsiveness to NPY in gonadotrope-enriched pituitary cell cultures. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2283-2290, 2004.

HOLLMAN, P.C., KATAN, M.B. Bioavailability and health effects of dietary flavonoids in man. **Archives of Toxicology Supplement**, Berlin, v.20, p.237-248, 1998.

HOMMA, H.; KURACHI, H.; NISHIO, Y.; TAKEDA, T.; YAMAMOTO, T.; ADACHI, K.; MORISHIGE, K.-I.; OHMICHII, M.; MATSUZAWA, Y.; MURATA, Y. Estrogen Suppresses Transcription of Lipoprotein Lipase Gene. **Journal of Biological Chemistry**, 275: 11404-11411, 2000.

HU, C.; YUAN, Y.V.; KITTS, D.D. Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2219-27, 2007.

IMRAN, M.; KHAN, H.; SHAH, M.; KHAN, R.; KHAN, F. Chemical composition and antioxidant activity of certain Morus species. **Journal of Zhejiang University - Science B**, v. 11, p. 973-980, 2010.

IQBAL, S.; YOUNAS, U.; SIRAJUDDIN, CHAN, K. W.; SARFRAZ, R. A.; UDDIN, K. Proximate composition and antioxidant potential of leaves from three varieties of Mulberry (*Morus* sp.): a comparative study. **International Journal Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 6651-6664, 2012.

ISIDORO, B.; LOPE, V.; WHELAN, D. et al. Use of hormone therapy and isoflavones and mammographic density in Spain. **Menopause**, v. 23, p. 556-564, 2016.

JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. *In vitro* evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, n. 1, p. 410-418, 2007.

JENKINS, D. J.; KENDALL, C. W.; VIDGEN, E.; AGARWAL, S.; RAO, A. V.; ROSENBERG, R. S.; DIAMANDIS, E. P.; NOVOKMET, R.; MEHLING, C. C.; PERERA, T.; GRIFFIN, L. C.; CUNNANE, S. C. Health aspects of partially defatted flaxseed, including effects on serum lipids, oxidative measures, and ex vivo androgen and progestin activity: a controlled crossover trial. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 69, p. 395-402, 1999.

JIMÉNEZ, F. E. G. **Caracterización de compuestos fenólicos presente en la semilla y aceite de chía (*Salvia hispanica* L.), mediante electroforesis capilar**. 2010. 101p. Tese (Mestrado em Ciências em Alimentos). Instituto Politécnico Nacional Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Cidade do México, 2010.

JUNG, U.J., LEE, M., PARK, Y.B., KANG, M.A., CHOI, M. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 1134-1145, 2006.

JÚNIOR, I.D.S.; BARBOSA, H.M.; CARVALHO, D.C.R.; BARROS, R.A.; ALBUQUERQUE, F.P.; DA SILVA, D.H.A.; SOUZA, G.R.; SOUZA, N.A.C.; ROLIM,

- L.A.; SILVA, F.M.M.; DUARTE, G.I.B.P.; ALMEIDA, J.R.G.D.S.; DE OLIVEIRA JÚNIOR, F.M.; GOMES, D.A.; LIRA, E.C. Brazilian *Morus nigra* Attenuated Hyperglycemia, Dyslipidemia, and Prooxidant Status in Alloxan-Induced Diabetic Rats. **The Scientific World Journal**, v. 2017, p. 1-10, 2017.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. *Técnicas Básicas de Citologia e Histologia*. São Paulo: **Editora Santos**, 1983.
- KAJLA, P.; SHARMA, A.; SOOD, D. R. Flaxseed – a potencial functional food source. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 1857–1871, 2015.
- KAMEI, Y.; SUZUKI, M.; MIYAZAKI, H.; TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; WU, J.; ISHIMI, Y.; EZAKI, O. Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 51, p. 110-117, 2005.
- KASOTE, D.M. Flaxseed phenolics as natural antioxidants. **International Food Research Journal**, n. 20, p. 27-34, 2013.
- KATO, T.A.; HAYAKAWA, K.; MONJI, A.; KANBA, S. Missing and Possible Link between Neuroendocrine Factors, Neuropsychiatric Disorders, and Microglia. **Frontiers in Integrative Neuroscience**, v. 15, n. 7, p. 53, Jul., 2013.
- KATARE, C.; SAXENA, S.; AGRAWAL, S.; PRASAD, G.B.K.S.; BISEN, P.S. Flax Seed: a potential medicinal food. **Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 2, 2012.
- KAYA, C.; CENGİZ, H.; YEŞİL, A.; EKİN, M.; YAŞAR, L. The relation among steroid hormone levels, lipid profile and menopausal symptom severity. **Journal of Psychosomatic Obstetrics & Gynecology**, v. 38, n. 4, p. 284-291, 2017.
- KEEN-RHINEHART, E.; KALRA, S.P.; KALRA, P.S. Leptin-receptor gene transfer into the arcuate nucleus of female Fatty Zucker rats using recombinant adeno-associated viral vectors stimulates the hypothalamo-pituitary-gonadal axis. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 1, p. 266-272, 2004.
- KHALESI S, JAMALUDDIN R, ISMAIL A. Effect of raw and heated flaxseed (*Linum Usitatissimum* L.) on blood lipid profiles in rats. **IJAST**, v. 1, p. 84-89, 2011.
- KING, R. A.; BROADBENT, J. L.; HEAD, R. J. Absorption and excretion of the soy isoflavone genistein in rats. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 176–182, 1996.
- KINNIRY, P. et al. Dietary flaxseed supplementation ameliorates inflammation and oxidative tissue damage in experimental models of acute lung injury in mice. **Journal of Nutrition**, v.136, n.6, p.1545-51, 2006.
- KIRILMAZ, B.; ASGUN, F.; ALIOGLU, E.; ERCAN, E.; TENGİZ, I.; TURK, U.; SAYGI, S.; OZERKAN, F. High inflammatory activity related to the number of metabolic syndrome components. **The Journal of Clinical Hypertension (Greenwich)**, v. 12, n. 2, p. 136-44, 2010.
- KLEINER, D.E.; BRUNT, E.M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C.; CONTOS, M.J.; CUMMINGS, O.W.; FERRELL, L.D.; LIU, Y.C.; TORBENSON, M.S.; UNALP-ARIDA,

A.; YEH, M.; MCCULLOUGH, A.J.; SANYAL, A.J. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, n.6, p. 1313-21, 2005.

KOMESAROFF, P.A.; PRETO, C.V.; SUDHIR, K. Efeitos do extrato de inhame selvagem sobre os sintomas da menopausa, lipídeos e hormônios sexuais em mulheres saudáveis na menopausa. **Climatério**, v. 2, n. 4, p. 144-50, 2001.

KRAVITZ, H.M.; ZHAO, X.; BROMBERGER, J.T., et al. Sleep disturbance during the menopausal transition in a multi-ethnic community sample of women. **Sleep**, v. 31, p. 979–990, 2008.

KURZ, S.G.; DENNISON, K.L.; SAMANAS, N.B.; HICKMAN, M.P.; ECKERT, Q.A.; WALKER, T.L.; CUPP, A.S.; SHULL, J.D. Ept7 influences estrogen action in the pituitary gland and body weight of rats. **Mamm Genome**, v. 25, n.5-6, p. 244-52, 2014.

LAGOURI, V.; BOSKOU, D. Screening for antioxidant activity of essential oils obtained from spices. *Generation, Analysis and Process Influence* (ed. Charalambous, G.), p. 869-879, **Elsevier Science B.V.: London**, 1995.

LAMPE, J.W. Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. **Journal of Nutrition**, v. 133, p. 956S–964S, 2003.

LARSON, R. A. *Naturally Occurring Antioxidants*, **Lewis Publishers: New York**, p. 1, 1997.

LEE, D.S.; LEE, S.H. Genistein, a soy isoflavone, is a potent  $\alpha$ -glucosidase inhibitor. **FEBS Letters**, v. 501, p. 84-86, 2001.

LEE, S.W.; JO, H.H.; KIM, M.R.; et al. Association between menopausal symptoms and metabolic syndrome in postmenopausal women. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 285, p. 541–548, 2012.

LEVINE, K.B.; WILLIAMS, R.E.; HARTMANN, K.E. Vulvovaginal atrophy is strongly associated with female sexual dysfunction among sexually active postmenopausal women. **Menopause**, v. 15, p. 661-666, 2008.

LUCAS, E. A.; WILD, R.D.; HAMMOND, L.J.; KHALIL, D.A.; JUMA, S.; DAGGY, B.P.; STOECKER, B.J.; ARJMANDI, B.H. Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, p. 1527-1532, 2002.

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; DE, NAGEM, T.J.; PINTO, A.S. Flavonóides. **Biotecnologia ciência & desenvolvimento**, v.17, p.18-22, 2000.

LÓRÁND T, VIGH E, GARAI J. Hormonal action of plant derived and anthropogenic non-steroidal estrogenic compounds: phytoestrogens and xenoestrogens. **Current Medicinal Chemistry**, 17:3542-74, 2010.

MACKEY, R.; EDEN, J. Phytoestrogens and the menopause. **Climacteric**, v.1, n.4, p.302-308, 1998.

- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal American Oil Society**, v. 45, p. 594, 1968.
- MARCONDES, F.K.; BIANCHI, F.J.; TANNO, A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.
- MARINHO, B.C.; GUERRA, L.P.; DRUMMOND, J.B.; SILVA, B.C.; SOARES, M.M. The burden of osteoporosis in Brazil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 5, p. 434-443, 2014.
- MARQUES, C.V.; TEIXEIRA, V.A. Efeitos do extrato aquoso de *Morus nigra* L. (amora-preta) sobre níveis plasmáticos de colesterol total, HDL e glicose de ratos wistar. [Internet]. [Acesso em: Outubro 2018]. 2009 Disponível em: [http://www.ufpel.tche.br/cic/2009/cd/pdf/CB/CB\\_01065.pdf](http://www.ufpel.tche.br/cic/2009/cd/pdf/CB/CB_01065.pdf)
- MATSUMOTO, N.; OKUSHIO, K.; HARA, Y. Effect of black tea polyphenols on plasma lipids in cholesterol-fed rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology** (Tokyo), v. 44, p. 337-42, 1998.
- MATT, D. W.; KAUMA, S. W, PINCUS, S. M, VELDHUIS, J.D.; EVANS, W.S. Characteristics of luteinizing hormone secretion in younger versus older premenopausal women. **American Journal Obstetrics and Gynecology**, v.78, p.504-410, 1998.
- MATUSIEWICZ, M.; KOSIERADZKA, I.; SOBCZAK-FILIPIAK, M.; ZUK, M.; SZOPA, J. Transgenic flax overexpressing polyphenols as a potential anti-inflammatory dietary agent. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 299-307, 2015.
- MCMILLAN, T.L.; MARK, S. Complementary and alternative medicine and physical activity for menopausal symptoms. **JAMA**, v.59, p.270-277, 2004.
- MELO, S. S.; SILVEIRA, B. M.; STEFANES, F. B.; TOMIO, T. A.; TISCHER, C. A. Efeito da Goma Arábica nas Concentrações de Colesterol Hepático, Sérico e Fecal de Ratos Alimentados com Semente de Linhaça, Óleo de Linhaça e Colesterol Sintético. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.19, n.2, p. 133-144, abr./jun. 2008.
- MENDELSON, M. E.; KARAS, R. H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. **The New England Journal of Medicine**. v. 340, p. 1801-11, 1999a.
- MENESES, Juliana Azevedo de. **Estudo da utilização da semente de linhaça como fonte de ácido graxo ômega-3, como um possível mecanismo regulatório antiestresse em ratos**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Medicina, 2018.
- MILLÁN, J.; PINTÓ, X.; MUÑOZ, A.; ZÚÑIGA, M.; RUBIÉS-PRAT, J.; PALLARDO, L.F.; MASANA, L.; MANGAS, A.; HERNÁNDEZ-MIJARES, A.; GONZÁLEZ-SANTOS, P.; ASCASO, J.F.; PEDRO-BOTET, J. Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. **Vascular Health and Risk Management**. v. 5, p. 757-65, 2009.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **Journal American**

**Oil Society**, v. 48, p. 91. 1971.

MOLENA-FERNANDES, C. A. Avaliação dos efeitos da suplementação com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução ponderal em ratos Wistar. **Revista Brasileira Plantas Medicinai**s, v.12, p. 201- 207, 2010.

MONFORTE, M. T.; SMERIGLIO, A.; GERMANÒ, M.P.; PERGOLIZZI, S.; CIRCOSTA, C.; GALATI, E.M. Evaluation of antioxidant, antiinflammatory, and gastroprotective properties of *Rubus fruticosus* L. fruit juice. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 7, p.1404-1414, 2018.

MOREIRA, A.C.; SILVA, A.M.; SANTOS, M.S.; SARDÃO, V.A. Phytoestrogens as alternative hormone replacement therapy in menopause: What is real, what is unknown. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 143, p. 61-71, Sep., 2014.

MOREIRA, L. Q.; PADILHA, M. M.; MORAIS F. F.; ARAÚJO T. H.; SILVA G. A. Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 621-626, 2010.

MORIARITY, J. T.; FOLSOM, A. R.; IRIBARREN, C.; NIETO, F. J.; ROSAMOND, W. D. Serum uric acid and risk of coronary heart disease: Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Annals of Epidemiology**, v. 10, n. 3, p. 136-43, 2000.

MORRIS, D.H. Descripción y Composición de la Linaza. Linaza - **Una Recopilación sobre sus Efectos em la Salud y Nutrición**. CANADA, F.C.O. p. 9-21, 2007.

MORISE, A.; SEROUGNE, C.; GRIPOIS, D.; BLOUQUIT, M.; LUTTON, C.; HERMIER, D. Effects of dietary alpha linolenic acid on cholesterol metabolism in male and female hamsters of the LPN strain. **Journal of Nutrition Biochemics**, v.15, p. 51-61, 2004.

MUN, S.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D.J. Influence of emulsifier type on in vitro digestibility of lipid droplets by pancreatic lipase. **Food Research International**, v. 40, p. 770–781, 2007.

NACIFF, J. M.; OVERMANN, G. J.; TORONTALI, S. M.; CARR, G. J.; TIESMAN, J. P.; DASTON, G. P. Impact of the Phytoestrogen Content of Laboratory Animal Feed on the Gene Expression Profile of the Reproductive System in the Immature Female Rat. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n.15, p.1519–1526, 2004.

NADERI, G.A.; ASGARY, S.; SARRAF-ZADEGAN, N.; OROOJY, H.; AFSHIN-NYA, F. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. **Phytotherapy Research**, v.18, p.365-369, 2004.

NAFTOLIN, F.; GUADALUPE STAMBURY, M. Phytoestrogens: are they really estrogen mimics? **Fertility and Sterility**, v. 77, n. 1, p. 15-17, 2002.

NAKAMURA Y. et al. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 3309-3312, 2003.

NAM, M. K.; CHOI, H.R.; CHO, J.S.; CHO, S.M.; HA, K.C.; KIM, T.H.; RYU, H.Y.; LEE Y. I. Inhibitory effects of *Rubi Fructus* extracts on hepatic steatosis development in

high-fat diet-induced obese mice. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 4, p. 1821-1827, 2014.

NANDINI, M.S.; VEENA, T.; SWAMY, M.N. Effect of extracts of murraya koenigii spreng. And morus alba linn. On the age of attainment of puberty and ovarian folliculogenesis in rats. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 1, n. 4, p. 203-207, 2010.

NAVARRO, V. M.; TENA-SEMPERE, M. Kisspeptins and the neuroendocrine control of reproduction. **Frontiers in Bioscience**, v. 3, p.267-275, 2011.

NDEBELE, K.; GRAHAM, B.; TCHOUNWOU, P. B. Estrogenic activity of coumestrol, DDT, and TCDD in human cervical cancer cells. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 2045-2056, 2010.

NESBITT, P. D.; THOMPSON, L. U. Lignans in homemade and commercial products containing flaxseed. **Nutrition and Cancer**, v. 29, p. 222-227, 1997.

NIETO, F. J.; IRIBARREN, C.; GROSS, M. D.; COMSTOCK, G. W.; CUTLER, R. G. Uric acid and serum antioxidant capacity: a reaction to atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 148, p. 131-139, 2000.

NOGUEIRA, E.; ROSA, G.J.; HARAGUCHI, M.; VASSILIEFF, V.S. Anxiolytic effect of Rubus brasiliensis in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacological**, v. 61, n. 2, p. 111-117, 1998.

NOVELLO, D.; POLLONIO, M. A.R. Caracterização e propriedades da linhaça (Linum usitatissimum L.) e subprodutos. **Boletim do Ceppa**, v. 29, n. 2, p. 317- 330, 2011.

NUUTILA, A. M.; PUUPPONEN-PIMIA, R.; AARNI, M.; OKSMAN-CALDENTY, K. M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry**, London, v. 81, p. 485-93, 2003.

OCCHIUTO, F.; PASQUALE, R.D.; GUGLIELMO, G.; PALUMBO, D.R.; ZANGLA, G.; SAMPERI, S.; RENZO, A.; CIRCOSTA, C. Effects of phytoestrogenic isoflavones from red clover (Trifolium pratense L.) on experimental osteoporosis. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 2, p.130-4, 2007.

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. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de Morus nigra L. (Moraceae). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 15, p. 244-249, 2013.

OOMAH, B.D. Flaxseed as a functional food source. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.81, n.9, p.889-94, 2001.

PADILHA, P. C.; PINHEIRO, R. L. O Papel dos Alimentos Funcionais na Prevenção e Controle do Câncer de Mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 3, p. 251-260, 2004.

PADILHA, Marina de Mesquita. **Estudo farmacognóstico, fitoquímico e**

**farmacológico das folhas de *Morus nigra* L. (amoreira-preta).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2009.

PADILHA, M.M.; VILELA, F.C.; ROCHA, C.Q.; DIAS, M.J.; SONCINI, R.; SANTOS, M.H.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. **Phytotherapy Research**, 2010. DOI: 10.1002/ptr.3134.

PAWLOWSKA, A.M.; OLESZEK, W.; BRACA, A. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3377–3380, 2008.

PELLOW, S.; FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 24, n.3, p. 525-529, 1986.

PEREIRA, U.P.; OLIVEIRA, D.G.S.; MESQUITA, L.R., et al. Efficacy of *Staphylococcus aureus* vaccines for bovine mastitis: A systematic review. **Veterinary Microbiology**, v. 24, p.117–124, 2011.

POLUZZI et al. Phytoestrogens in Postmenopause: The State of the Art from a Chemical, Pharmacological and Regulatory Perspective. **CMC**, v. 21, n. 4, p.417-436, 2013.

POWER, K.A.; WARD, W.E.; CHEN, J.M.; SAARINEN, N.M.; THOMPSON, L.U. Flaxseed and soy protein isolate, alone and in combination, differ in their effect on bone mass, biomechanical strength, and uterus in ovariectomized nude mice with MCF-7 human breast tumor xenografts. **Journal Toxicology Environmental Health part A**, v. 70, n. 22, p. 1888-1896, 2007.

QUEIROZ, G.T.; SANTOS, T.R.; MACEDO, R.; PETERS, V. M.; LEITE, M. N.; SILVEIRA, SÁ. R.; GUERRA, M. O. Efficacy of *Morus nigra* L. on reproduction in female Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 816-822, 2012.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** Viena, 2014. Disponível em: <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

REBOUÇAS E.C.; LEAL, S; SÁ S. Regulation of NPY and  $\alpha$ -MSH expression by estradiol in the arcuate nucleus of Wistar female rats: a stereological study. **Neurological Research**, v. 38, n.8, p.740-747, 2016.

REED, S.D.; LAMPE, J.W.; QU, C., et al. Premenopausal vasomotor symptoms in an ethnically diverse population. **Menopause**, v. 21, p. 153–158, 2014.

RODRIGUEZ- LEYVA, D.; BASSETT, C.M.; MCCULLOUGH, R.; PIERCE, G.N. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega- 3 fatty acid, alpha- linolenic acid. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 26, p. 489–496, 2010.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v. 92, p. 235, 2005.

RONCHETTI, S. A.; MILER, E. A.; DUVILANSKI, B. H.; CABILLA, J. P. Cadmium



Mimics Estrogen-Driven Cell Proliferation and Prolactin Secretion from Anterior Pituitary Cells. **PLoS One**, v. 8, n.11, e81101, 2013.

ROSSOUW, J.E.; ANDERSON, G.L., PRENTICE R.L. et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. **JAMA**, v.288, n.3, p.321-333, 2002.

SACCO, S. M.; JIANG, J. M. Y.; REZA-LÓPEZ, S.; MA, D. W. L.; THOMPSON, L. U.; WARD, W. E. Flaxseed combined with low-dose estrogen therapy preserves bone tissue in ovariectomized rats. **The Journal of the North American Menopause Society**, v. 16, n. 3, p. 545-554, 2009.

SALVATORE, S.; LEONE ROBERTI MAGGIORE, U.; ATHANASIOU, S.; ORIGONI, M.; CANDIANI, M.; CALLIGARO, A, et al. Histological study on the effects of microablative fractional CO2 laser on atrophic vaginal tissue: an ex vivo study. **Menopause**, v. 22, n. 8, p. 845-9, 2015.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v, 76, 270, 1998.

SANTELL, R.C.; CHANG, Y.C.; NAIR, M.G.; HELFERICH, W.G. Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 127, n. 2, p. 263-269.

SANTORO N, KOMI J. Prevalence and impact of vaginal symptoms among postmenopausal women. **The Journal of Sexual Medicine**, v. 6, p. 2133–2142, 2009.

SANTORO, N.; EPPERSON, C.N.; MATHEWS, S.B. Menopausal Symptoms and Their Management. **Endocrinology & Metabolism Clinics of North America**, v. 44, n. 3, p. 497-515, 2015.

SARTORI, C. J. **Avaliação dos teores de compostos fenólicos nas cascas de Anadenanthera peregrina (angico-vermelho)**. 2012. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia da Madeira. Universidade Federal de Lavras, 2012.

SAWANT, S.H.; BODHANKAR, S.L. Flax lignan concentrate reverses alterations in blood pressure, left ventricular functions, lipid profile and antioxidant status in DOCA-salt induced renal hypertension in rats. **Renal Failure**, v. 38, n.3, p. 411-23, 2016.

SCHERNHAMMER, E.; HANKINSON, S.E.; ROSNER, B.; KROENKE, C.H.; WILLETT, W.C.; COLDITZ, G.A.; KAWACHI, I. Job Stress and Breast Cancer Risk: The Nurses' Health Study. **American Journal of Epidemiology**, v.160, n.11, p.1079-1086, 2004.

SCHRÖEDER, J. M.; SANTOS, P. EFEITOS DO USO CRÔNICO DA SEMENTE DE

LINHAÇA (*Linum usitatissimum*) SOBRE A FUNÇÃO INTESTINAL E VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL EM MULHERES. **Edição Especial - I SIPEX - Seminário Integrado de Pesquisa e Extensão Universitária**, v. 16, n. 2, 2009.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 4 ed., São Paulo: Manole, 2001.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Arlington, v. 30, n. 3, p. 507–512, 1974.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n.8, p. 2432-2438, 2002.

SHALE, T.L.; STIRK, W.A.; VAN STADEN, J. Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.325-330, 2005.

SHAPIRO, H.; TEHILLA, M.; ATTAL-SINGER, J.; BRUCK, R.; LUZZATTI, R.; SINGER, P. The therapeutic potential of long-chain omega-3 fatty acids in nonalcoholic fatty liver disease. **Clinical Nutrition**. v. 30, p. 6–19, 2011.

SHARMA, R.; SHARMA, N.K.; THUNGAPATHRA, M. Resveratrol regulates body weight in healthy and ovariectomized rats. **Nutrition & Metabolism**, v. 14, p. 30, 2017.

SHEPHERD, J.E. Effects of Estrogen on Cognition, Mood, and Degenerative Brain Diseases. **Journal of the American Pharmacists Association**. v. 41, n. 2, p. 221-228, 2001.

SHIKE, M.; DOANE, A.S.; RUSSO, L., et al. The effects of soy supplementation on gene expression in breast cancer: a randomized placebo-controlled study. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, p. 106, 2014.

SHUGHRUE, P.J.; LANE, M.V.; MERCHENTHALER, I. Comparative distribution of estrogen receptor alpha and beta mRNA in the rat central nervous system. **Journal of Comparative Neurology**, v. 388, n. 4, p. 507-525, 1997.

SIGER, A.; NOGALA- KALUCKA, M.; LAMPART- SZCZAPA, E. THE CONTENT AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN COLD- PRESSED PLANT OILS. **Journal of Food Lipids**, v. 15, n. 2, 2008.

SILVA, V.O.; FOUREAUX, R.C.; ARAUJO, T.S., et al. Effect of Probiotic Administration on the Immune Response: A Systematic Review of Experimental Models in Rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 55, p. 685-694, 2012.

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.04, p. 618-626, 2008.

- SIMONS; RUDY et al. Prenylated isoflavonoids from plants as selective estrogen receptor modulators (phytoSERMs). **Food & Function**, v. 3, n. 8, p.810-827, 2012.
- SINGH H, YE. A.; HORNE, D. Structuring food emulsions in the gastrointestinal tract to modify lipid digestion. **Progress in Lipid Research**, v. 48, p. 92–100, 2009.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 20, p. 144-58, 1965.
- SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos como Antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15 n.1, 2002.
- SOARES, C.N. Depression in peri and postmenopausal women: prevalence, patho-physiology and pharmacological management. **Drugs Aging**, v. 30, p. 677–685, 2013.
- SOARES, C. N.; PROUTYA, J.; POITRASA, J. Ocorrência e tratamento de quadros depressivos por hormônios sexuais depressivos por hormônios sexuais. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 24, p. 48-54, 2002.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. V.; AYRES. M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.
- SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**. v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.
- STAHL, S.M. Natural Estrogen as an antidepressant for women. **Journal of Clinical Psychiatry**, v. 62, p. 404-405, 2001.
- STURDEE, D. W.; PANAY, N. Recommendations for the management of postmenopausal vaginal atrophy. **Climacteric**, v. 13, n. 6, p. 509-522, 2010.
- SZABO, J.; IBRAHIM, W. H.; SUNVOLD, G. D.; BRUCKNER, G. G. Effect of dietary protein quality and essential fatty acids on fatty acid composition in the liver and adipose tissue after rapid weight loss in overweight cats. **American Journal Veterinary Research**, v. 64, n.3, p. 310-315, 2003.
- TAJIRI, K.; SHIMIZU, Y. Liver physiology and liver diseases in the elderly. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, p. 8459-8467, 2013.
- TOMAZ PACHECO, J.; BELTRAME DALEPRAME, J.; TELES BOAVENTURA, G. Impact of dietary flaxseed (linum usitatissimum) supplementation on biochemical profile in healthy rats. **Nutrición Hospitalaria**, v. 26, n. 4, p. 798-802, 2011.
- TIKKANEN, M. J.; VIHMA, V.; JAUHAINEN, M.; HÖCKERSTEDT, A.; HELISTEN, H.; KAAMANEN, M. Lipoprotein-associated estrogens. **Cardiovascular Research**, v. 56, p. 184-188, 2002.
- TRAVIS, R. C; KEY, T. J. Oestrogen exposure and breast cancer risk. **Breast Cancer Research (Springer Nature)**, v. 5, n. 5, p.239-247, 2003.
- VANONI, A. P. N. B. **Avaliação da atividade fitoestrogênica do extrato**

**hidroalcoólico e da infusão das folhas de *Morus nigra* L.** Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

VELIOGLU, Y.S. et al. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, n.10, p.4113-4117, 1998.

VIEIRA, J. R.; SILVA, G.M.; BITTENCOURT, H.R.; CHAVES, T.C.; M.H. Terpenos e ácidos graxos de *Dipteryx lacunifera* Ducke. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1658-1662, Jul., 2007.

VILELA, M. G.; SANTOS JÚNIOR, J. L.; SILVA, J. G. C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, v. 35, n.10, p. 667-670, 2007.

VIJAIMOHAN, K. et al. Beneficial effects of alpha linolenic acid rich flaxseed oil on growth performance and hepatic cholesterol metabolism in high fat diet fed rats. **Life Sciences**, v.79, n.5, p.448-454, 2006.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (*Rubus* sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1209-1214, 2011.

VOLPATO, G.T.; CALDERON, I.M.; SINZATO, S.; CAMPOS, K.E.; RUDGE, M.V.; DAMASCENO, D.C. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal Ethnopharmacology**, v. 138, n. 3, p. 691-696, 2011.

WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.48, n.2, p.140-146, 2000.

WANG, C. C., PRASAIN, J. K., AND BARNES, S. Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 777, n. 1-2, p. 3-28, 2002.

WANG, S.Y.; BOWMAN, L.; DING, M. Methyl jasmonate enhances antioxidant activity and flavonoid content in blackberries (*Rubus* sp.) and promotes antiproliferation of human cancer cells. **Food Chemistry**, Oxford, v.107, n.3, p.1261-1269, 2008.

WANG, L.; GONG, T.; CHEN, R.Y. Two new prenylflavonoids from *Morus nigra* L. **Chinese Chemical Letters**, v.20, p.1469-1471, 2009.

WANG, L.; YANG, Y.; LIU, C.; CHEN, R.Y. Three new compounds from *Morus nigra* L. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 12, p. 431-437, 2010.

WANG, Y.F.; XU, Z. K.; YANG, D. H.; YAO, H. Y.; KU, B. S.; MA, X. Q.; WANG, C. Z.; LIU, S. L.; CAI, S. Q. The antidepressant effect of secoisolariciresinol, a lignan-type phytoestrogen constituent of flaxseed, on ovariectomized mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, p. 222-227, 2013.

- WANG, M.; ZHANG, X. J.; FENG, K.; HE, C.; LI, P.; HU, Y. J.; SU, H.; WAN, J. B. Dietary alpha-linolenic acid-rich flaxseed oil prevents against alcoholic hepatic steatosis via ameliorating lipid homeostasis at adipose tissue-liver axis in mice. **Scientific Reports – Nature**, v. 6, p. 26826, 2016.
- WATKINS, B. A.; REINWALD, S.; LI, Y.; SEIFERT, M. F. Protective actions of soy isoflavones and n-3 PUFAs on bone mass in ovariectomized rats. **The Journal Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 479-488, 2005.
- WHARTON, W.; GLEASON, C.E.; SANDRA OLSON, R.; CARLSSON, C.M.; ASTHANA, S. Neurobiological underpinnings of the estrogen – mood relationship. **Current Psychiatry Reviews**, v. 8, n. 3, p. 247–256, 2012.
- WHITTEN, P. L.; LEWIS, C.; RUSSEL, E.; NAFTOLIN, F. Potential adverse effects of phytoestrogens. **Journal of Nutrition**, v. 125, p. 771S–776S, 1995.
- WISE, P.M.; SMITH, M.J.; DUBAL, D.B.; WILSON, M.E.; KRAINAK, K.M.; ROSEWELL, K.L. Neuroendocrine influences and repercussions of the menopause. **Endocrine Reviews**, v.20, n.3, p. 243-248, 1999.
- WOODS, N.F.; MARIELLA, A.; MITCHELL, E.S. Patterns of depressed mood across the menopausal transition: approaches to studying patterns in longitudinal data. **Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica**, v. 81, p. 623– 632, 2002.
- WROLSTAD, R. E.; DURST, R. W.; LEE, J. Tracking color and pigment changes in anthocyanin products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 423-428, 2005.
- YAFFE, K.; SAWAYA, G.; LIEBERBURG, I.; GRADY, D. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. **JAMA**, v. 279, p. 688-695, 1998.
- YU, W.H.; KIMURA, M.; WALCZEWSKA, A.; KARANTH, S.; MCCANN, S.M. Role of leptin in hypothalamic- pituitary function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 3, p.1023-1028, Jul., 1997.
- ZANWAR, A. A.; ASWAR, U. M.; HEGDE, M. V.; BODHANKAR, S. L. Estrogenic and Embryo-Fetotoxic Effects of Ethanol Extract of *Linum usitatissimum* in Rats, **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 7, n. 1, 2010.
- ZELEZNIK, A. J. Follicle selection in primates: “many are called but few are chosen”. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 655-659, 2001.
- ZINGUE, S.; NJAMEN, D.; TCHOUMTCHOUA, J.; HALABALAKI, M.; SIMPSON, E.; CLYNE, C.; MAGNE NDE, C.B. Effects of *Millettia macrophylla* (Fabaceae) extracts on estrogen target organs of female wistar rat. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Aichi, v. 123, n. 2, p. 120-123, 2013.
- ZHAO, W.; WEN, H.X.; ZHENG, H.L.; SUN, S.X.; SUN, D.J.; NI, J. Action mechanism of Zuo Gui Yin Decoction's promotion on estradiol production in rats during the peri-menopausal period. **Journal Ethnopharmacology**, v. 134, n. 1, p. 122-9, 2011.

ZHANG, X.; WANG, H.; YIN, P.; FAN, H.; SUN, L.; LIU, Y. Flaxseed oil ameliorates alcoholic liver disease via anti-inflammation and modulating gut microbiota in mice. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1 p. 44, 2017.

**ANEXOS****ANEXO 1****UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cx.P.3037 - Lavras – MG – 37200-000 – (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

**ATESTADO DE APROVAÇÃO PROVISÓRIO**

**(o certificado definitivo será concedido após o cumprimento de todos os critérios exigidos pela Orientação Técnica nº 5, de 27 de abril de 2015, do CONCEA/MCTI)**

Atestamos que a proposta intitulada "Possíveis efeitos estrogênicos da suplementação com linhaça e/ou extrato da folha de amora sobre o organismo de ratas ovariectomizadas", protocolo nº 013/17, sob a responsabilidade de Bruno Del Bianco Borges e Josilene Nascimento Seixas, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 28/09/17, podendo ser iniciada a realização da sua parte experimental.

Vigência da autorização: de 01/11/2017 a 30/10/2019

Finalidade: ( ) Ensino (x) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: Rato Heterogênico / Wistar

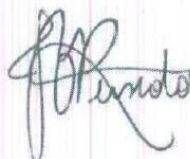
Número de animais aprovados: 40

Peso/Idade: 180g / 60 dias

Sexo: fêmeas

Origem dos animais: aguardando documentação

Lavras, 28 de setembro de 2017.



Prof. Juliano Vogas Peixoto  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras  
Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes  
Campus Universitário -  
Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 – Lavras, MG - Brasil  
Tel.: +55 (35) 3829 5182  
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br