



THAYS CRISTINA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM
ÁCIDOS HÚMICOS DERIVADOS DE VERMICOMPOSTO
SOBRE A COMPOSIÇÃO MINERAL ÓSSEA E
MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CAMUNDONGOS OVARIECTOMIZADAS**

**LAVRAS-MG
2025**

THAYS CRISTINA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÁCIDOS HÚMICOS
DERIVADOS DE VERMICOMPOSTO SOBRE A COMPOSIÇÃO MINERAL ÓSSEA
E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS
OVARIECTOMIZADAS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, para obtenção do título de Mestre.

**Prof. Dr. Eric Francelino Andrade
Orientador**

**LAVRAS-MG
2025**

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

Santos, Thays .

Avaliação dos efeitos do tratamento com ácidos húmicos derivados de
vermicomposto sobre a composição mineral óssea e marcadores de estresse oxidativo
em camundongos ovariectomizadas / Thays Santos. - 2025.

47 p. : il.

Orientador: Eric Francelino Andrade

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2025.
Bibliografia.

1. Menopausa. 2. Substâncias húmicas. 3. Osso. 4. Produtos naturais . I.
Francelino Andrade , Eric. II. Universidade Federal de Lavras. III. Título.

THAYS CRISTINA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO COM ÁCIDOS HÚMICOS
DERIVADOS DE VERMICOMPOSTO SOBRE A COMPOSIÇÃO MINERAL ÓSSEA
E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CAMUNDONGOS
OVARIECTOMIZADAS**

**HUMIC ACID DERIVED FROM VERMICOMPOST IMPROVES BONE MINERAL
CONTENT AND ALTERS OXIDATIVE STRESS MARKERS IN
OVARIECTOMIZED MICE**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das exigências
do Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Saúde, para obtenção do título de Mestre.

APROVADO em 1 de Setembro de 2025
Prof^a Dr^a Karine Beatriz Costa, UFJF
Prof^a Dr^a Natalia Oliveira, UNILAVRAS

Prof. Dr. Eric Francelino Andrade
Orientador

**LAVRAS-MG
2025**

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar minha mente e meu caminho, e por me mostrar que sou mais forte do que imaginava.

Aos meus pais, Francine e Vicente, pelo apoio às minhas escolhas, pelo incentivo a seguir meus sonhos e pela confiança depositada em mim. Vocês são meu porto seguro, e é reconfortante saber que, independentemente de onde o futuro me levar, sempre terei um lugar para retornar. Amo vocês de todo o meu coração.

À minha irmã, meu maior amor, agradeço por sempre acreditar em mim, por trazer calma nos momentos de tempestade, pelos conselhos e pela força que me transmite. Te admiro profundamente, te amo e tenho muito orgulho de você.

À minha namorada, meu ponto de paz, minha gratidão por estar ao meu lado em cada etapa. Obrigada por celebrar comigo as conquistas, dividir as lágrimas, por cada abraço e por fazer com que eu acredite que tudo dará certo. Compartilhar a vida com você tem sido incrível.

Ao meu orientador, professor Eric, por acreditar em meu potencial e me ensinar continuamente. Sou grata por sua paciência, por todo o apoio e pela dedicação. Admiro profundamente seu trabalho.

Aos meus amigos, pela presença constante, ainda que, por vezes, à distância. Obrigada pelo apoio e pelo carinho.

Um agradecimento especial à Karen, amiga que o mestrado me proporcionou, à Hellen, minha companheira de experimentos, e aos alunos de iniciação científica, Maria Luiza e Igor, que participaram de todas as etapas do projeto e se dedicaram ao máximo para contribuir. Obrigada pelas risadas, pelos dias compartilhados e por tornarem essa caminhada mais leve. Trabalhar com vocês foi uma experiência enriquecedora, e guardo um carinho enorme por cada um.

À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho desde o início, serei eternamente grata.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), cujos recursos disponibilizados sob processo APQ-01100-24, permitiram a execução deste estudo.

Muito obrigada!

RESUMO

O estrogênio é um hormônio essencial, produzido pelos ovários, com funções fundamentais tanto no sistema reprodutivo quanto em diferentes sistemas não reprodutivos. A sua redução durante a menopausa está associada a diversas complicações, entre elas o aumento do estresse oxidativo e o desenvolvimento da osteoporose. A queda dos níveis de estrogênio compromete a atividade das enzimas antioxidantes e favorece a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, promovendo um desequilíbrio na homeostase do organismo. A osteoporose, caracterizada pela perda de massa óssea e aumento da fragilidade, eleva o risco de fraturas graves, comprometendo a qualidade de vida dessas mulheres. Os tratamentos tradicionais apresentam efeitos colaterais, tornando necessária a busca por agentes que mitiguem a progressão da depressão estrogênica com menores impactos negativos. Dentre estes agentes, os ácidos húmicos (AH) têm se mostrado promissores devido às suas propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias e antioxidantes. Assim, objetivou-se com este estudo, avaliar os efeitos do tratamento com AH na composição mineral óssea e nos marcadores de estresse oxidativo em um modelo experimental de depleção estrogênica. Foram utilizadas 24 camundongos fêmeas C57BL/6, distribuídas em quatro grupos (n = 6/grupo): Sham; Sham + AH; Ovariectomizadas (OVX); e OVX + AH. O modelo experimental de depleção estrogênica foi induzido por ovariectomia bilateral no início do experimento. AH derivados de vermicompostagem de biomassa foram administrados por gavagem, diariamente, durante 28 dias. Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia, e foram coletados fêmures e fragmentos dos músculos gastrocnêmio, fígado e rim. A composição elementar óssea foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) associada à Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS). As atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), bem como as concentrações de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foram avaliadas nos tecidos musculares, renais e hepáticos. Os dados foram analisados por ANOVA two-way, seguida do teste post hoc de Bonferroni. Os animais ovariectomizados apresentaram redução significativa no conteúdo de cálcio femoral ($p < 0,05$). O tratamento com AH atenuou a queda nos níveis de cálcio e melhorou a razão Ca/P femoral ($p < 0,05$). A concentração de H_2O_2 foi reduzida no fígado e nos rins das camundongas OVX + AH em comparação com os animais não tratados ($p < 0,05$). A atividade da CAT no músculo foi maior no grupo OVX + AH em relação ao grupo OVX ($p < 0,05$). Conclui-se que o tratamento com ácido húmico promoveu melhorias na composição elementar femoral e modulou os marcadores de estresse oxidativo em um modelo experimental de menopausa.

Palavras-chave: Menopausa; Substâncias húmicas; Osso; Produtos naturais.

ABSTRACT

Estrogen is an essential hormone produced by the ovaries, with fundamental roles in both the reproductive system and various non-reproductive systems. Its reduction during menopause is associated with several complications, including increased oxidative stress and the development of osteoporosis. The decline in estrogen levels compromises the activity of antioxidant enzymes and promotes the production of reactive oxygen and nitrogen species, leading to an imbalance in the organism's homeostasis. Osteoporosis, characterized by bone mass loss and increased fragility, raises the risk of severe fractures, thereby compromising the quality of life of affected women. Traditional treatments present side effects, making it necessary to search for agents that can mitigate the progression of estrogen deficiency with fewer negative impacts. Among these agents, humic acids (HA) have shown promise due to their antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant properties. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of HA treatment on bone mineral composition and oxidative stress markers in an experimental model of estrogen depletion. Twenty-four female C57BL/6 mice were used, divided into four groups (n = 6/group): Sham; Sham + HA; Ovariectomized (OVX); and OVX + HA. The experimental model of estrogen depletion was induced by bilateral ovariectomy at the beginning of the experiment. HA derived from biomass vermicomposting was administered daily by gavage for 28 days. At the end of the experiment, the animals were euthanized, and femurs as well as fragments of gastrocnemius muscle, liver, and kidney were collected. Bone elemental composition was analyzed using Scanning Electron Microscopy (SEM) coupled with Energy-Dispersive Spectroscopy (EDS). The activities of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), as well as hydrogen peroxide (H₂O₂) concentrations, were evaluated in muscle, kidney, and liver tissues. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Ovariectomized animals showed a significant reduction in femoral calcium content ($p < 0.05$). Treatment with HA attenuated the decrease in calcium levels and improved the femoral Ca/P ratio ($p < 0.05$). H₂O₂ concentrations were reduced in the liver and kidneys of OVX + HA mice compared with untreated animals ($p < 0.05$). Muscle CAT activity was higher in the OVX + HA group compared with the OVX group ($p < 0.05$). In conclusion, treatment with humic acid improved femoral elemental composition and modulated oxidative stress markers in an experimental model of menopause.

Keywords: Menopause; Humic substances; Bone; Natural products

INDICADORES DE IMPACTO

O presente estudo apresenta impactos científicos, sociais e ambientais de grande relevância. Teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com ácido húmico (AH), obtido por vermicompostagem, sobre a composição mineral óssea e os marcadores de estresse oxidativo em fêmeas de camundongos submetidas à ovariectomia, modelo experimental da menopausa. Os resultados demonstraram que o tratamento com AH aumentou o teor de cálcio e melhorou a razão Ca/P nos fêmures, além de reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio e elevar a atividade da catalase em tecidos musculares e hepáticos, evidenciando seu efeito antioxidante. Esses achados indicam o potencial do AH como uma alternativa natural, segura e sustentável para a prevenção da osteopenia e do estresse oxidativo decorrentes da deficiência estrogênica. Do ponto de vista social e de saúde pública, os resultados são significativos, considerando que a osteoporose acomete cerca de um terço das mulheres acima de 50 anos e impõe elevados custos aos sistemas de saúde. O uso de compostos derivados de resíduos agrícolas processados por vermicompostagem contribui para o desenvolvimento sustentável, ao reduzir o descarte de resíduos orgânicos. Assim, o estudo abre perspectivas para o desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos de baixo custo, com potencial de aplicação em terapias mais seguras e eficazes para mulheres no período pós-menopausa, reforçando a importância do investimento em soluções baseadas em produtos naturais e mais sustentáveis. O trabalho resultou na publicação de um artigo na revista *Biomedicine* e será apresentado em 2025 no Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Lavras (CIUFLA).

IMPACT INDICATORS

The present study demonstrates highly relevant scientific, social, and environmental impacts. It aimed to evaluate the effects of treatment with humic acid (HA), obtained through vermicomposting, on bone mineral composition and oxidative stress markers in female mice subjected to ovariectomy, an experimental model of menopause. The results showed that HA treatment increased calcium content and improved the Ca/P ratio in femurs, in addition to reducing hydrogen peroxide levels and enhancing catalase activity in muscle and liver tissues, demonstrating its antioxidant effect. These findings indicate the potential of HA as a natural, safe, and sustainable alternative for the prevention of osteopenia and oxidative stress resulting from estrogen deficiency. From a social and public health perspective, the results are significant, considering that osteoporosis affects about one-third of women over 50 years old and imposes high costs on healthcare systems. The use of compounds derived from agricultural residues processed through vermicomposting contributes to sustainable development by reducing organic waste disposal. Thus, the study opens perspectives for the development of new low-cost biotechnological products with potential application in safer and more effective therapies for postmenopausal women, reinforcing the importance of investing in natural and more sustainable solutions. This work resulted in the publication of an article in the *Biomedicines* journal and will be presented in 2025 at the Scientific Initiation Congress of the Federal University of Lavras (CIUFLA).

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 Menopausa e a deficiência de estrogênio.....	12
2.2 Estresse oxidativo na menopausa	13
2.3 Antioxidantes.....	15
2.4 Osteoporose	17
2.5 Modelo de menopausa - Ovariectomia	19
2.6 Ácido Húmico (AH).....	19
SEGUNDA PARTE - ARTIGO	22
TERCEIRA PARTE – CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	41

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O estrogênio é um hormônio esteroide produzido principalmente pelos ovários, e desempenha funções cruciais tanto em órgãos reprodutivos quanto em sistemas não reprodutivos (Ikeda; Horie-inoue; Inoue, 2019). No entanto, o período de menopausa é caracterizado pela diminuição na concentração desse hormônio (Greendale, 1999). Com isso há um aumento no risco de aparecimento de diversas condições, como ganho excessivo de peso, adiposidade abdominal, pré-diabetes e diabetes, hipertensão, dislipidemia, riscos de depressão e distúrbios de humor, doenças cardiovasculares (DCV) e osteoporose (Davis *et al.*, 2023). É relatado também, que a diminuição na concentração de estrogênio pode desencadear um estado de estresse oxidativo em mulheres na menopausa (Iantomasi *et al.*, 2023), o que prejudica a homeostase, levando a danos celulares e teciduais (Al-Qaraleh *et al.*, 2022)

A osteoporose é uma doença caracterizada pela danificação da microarquitetura do tecido ósseo e perda de massa, deixando-o mais frágil e suscetível a fraturas (Clynes *et al.*, 2020). Cerca de 50% das mulheres adultas sofrerão uma ou mais fraturas por fragilidade ao longo da vida (Morin *et al.*, 2023). A prevalência global de osteoporose foi estimada em 41,5 milhões de casos, com projeções sugerindo que mais de 263,2 milhões de pessoas sofrerão o impacto da doença no futuro (Zhu, *et al.*, 2023). Devido aos efeitos colaterais relacionados às terapias atuais e seu custo elevado, se faz necessário novas alternativas mais seguras de tratamento (Davan *et al.*, 2023).

Atualmente, os inibidores da reabsorção óssea, como os bifosfonatos, calcitonina e estrogênio exógeno são os tratamentos mais utilizados em pessoas com osteoporose. No entanto, foram observados efeitos colaterais, como fraturas atípicas, hipocalcemia, anafilaxia, entre outros (Song *et al.*, 2022). Além do mais, a terapia hormonal com estrogênio foi associada ao aumento de casos de certos tipos de câncer, principalmente os de mama e endométrio (Liang; Shang, 2013). Outra alternativa terapêutica para a osteoporose tem sido a vitamina D, porém, estudos mostraram que em grandes doses, os riscos de fratura foram aumentados (Song *et al.*, 2022). Dessa maneira, a busca por novas terapias com menores efeitos colaterais e maior eficácia para prevenção ou tratamento da osteoporose são de interesse (Huyut; Bakan; Yildirim, 2021). Dentre os compostos com potencial para atenuar a reabsorção óssea, destacam-se os ácidos húmicos (AH).

Os AH são encontrados principalmente em solos, rios, oceanos e em carvão (Jung *et al.*, 2021). São formados naturalmente a partir de resíduos microbianos e decomposição de plantas,

por meio de reações químicas e físicas (Sarlaki *et al.*, 2019). Podem ser obtidos também por meio da vermicompostagem, que tem sido utilizada com muito sucesso para a estabilização desses materiais orgânicos ricos em nutrientes (Antunes *et al.*, 2015). Seu uso é mais comum como fertilizante, na nutrição e crescimento de plantas (Arif *et al.*, 2019). No entanto, devido às suas propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias e antioxidantes (Mudroňová *et al.*, 2021), atualmente sua utilização tem sido estudada também na área da medicina, e os resultados são promissores.

Estudos recentes avaliando a administração de ácido húmico em modelos experimentais indicaram que esses compostos podem atuar como cicatrizantes (Çalışır *et al.*, 2018), mostraram exercer efeitos benéficos no tratamento de colite (Huang *et al.*, 2023), além de demonstrar ser um bom agente anti-inflamatório minimizando a perda óssea em modelo de doença periodontal (Giordano *et al.*, 2025). Considerando que tanto a periodontite quanto a osteoporose compartilham mecanismos semelhantes que promovem a reabsorção óssea (Wang; McCauley, 2016) é plausível que agentes capazes de atenuar a perda óssea alveolar na periodontite também possam proporcionar melhorias no tecido ósseo afetado pela osteoporose. Embora os ácidos húmicos apresentem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias descritas em outros contextos, seus potenciais efeitos em modelos de menopausa ainda não foram suficientemente explorados. Portanto, nosso objetivo foi investigar os efeitos do tratamento com AH na composição elementar óssea e nos parâmetros de estresse oxidativo em um modelo experimental de menopausa induzida por ovariectomia.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Menopausa e a deficiência de estrogênio

A menopausa é definida como a cessação permanente da menstruação após 12 meses consecutivos, ocorrendo de forma progressiva e passando pelas fases de perimenopausa, menopausa inicial e menopausa tardia (Opoku, 2023). A perimenopausa, que geralmente começa entre 45 e 47 anos e dura em média 4 anos, é uma fase de transição que precede a última menstruação, caracterizada por baixas concentrações de estrogênio e progesterona e altos níveis de gonadotrofinas (FSH e LH) (Bruce; Rymer, 2009).

O estradiol ou estrogênio (E2) é considerado o principal hormônio feminino (Iorga *et al.*, 2017). Sua alta potência decorre da elevada afinidade pelos receptores para estrogênio, ao contrário da estrona, um estrógeno menos potente encontrado em mulheres pós-menopausa,

que pode ser convertido em E2 e vice-versa (Mohamad; Ima-Nirwana; Chin, 2020). O estrogênio é majoritariamente produzido pelos ovários, por meio da aromatização de andrógenos, processo estimulado pelo hormônio luteinizante (LH) nas células da teca e pelo hormônio folículo-estimulante (FSH) nas células da granulosa (Drummond; Findlay, 1999).

O estrogênio é responsável por regular diversas funções fisiológicas, como a homeostase de lipídeos e glicose, funções cerebrais, metabolismo ósseo, entre outras (Patel *et al.*, 2018). Estima-se que, durante o período fértil feminino, a concentração de estrogênio varie entre 100 e 250 pg/mL, enquanto na menopausa esse nível é reduzido para até 10 pg/mL (Ko; Kim, 2020). Essa redução hormonal desencadeia desequilíbrios metabólicos e hemodinâmicos (Innes; Selfe; Taylor, 2008).

O período de menopausa é caracterizado por ondas de calor, incontinência urinária, infecção do trato urinário, função sexual reduzida, atrofia vaginal (Greendale, 1999). Adicionalmente, condições mais graves estão intimamente associadas a essa redução nos níveis de estrogênio, como a síndrome metabólica, que engloba diversos fatores de risco para diabetes e doenças cardiovasculares, como resistência à insulina, hipertensão arterial, níveis elevados de triglicerídeos, baixos níveis de colesterol de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e obesidade, especialmente a adiposidade central (Pu *et al.*, 2017). Outra doença com alta prevalência que é associada aos baixos níveis de estrogênio é a osteoporose, que acomete principalmente mulheres na pós menopausa (Lindsay, 1996). Adicionalmente, é considerado que existe associação entre a que nos níveis de estrógenos na menopausa com o aumento do estresse oxidativo (Doshi; Agarwal, 2013).

2.2 Estresse oxidativo na menopausa

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, causado pelo aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e/ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), ou pela redução dos mecanismos de defesa antioxidante (Agarwal *et al.*, 2012). EROs são moléculas pequenas, de vida curta e extremamente reativas (Redza-Dutordoir; Averill-Bates, 2016). As mitocôndrias são as principais fontes de sua produção, sendo os principais locais os complexos I e III da cadeia respiratória (Hajam *et al.*, 2022). Além disso, eles podem ser gerados por NADPH oxidases (Nox) na membrana, xantina oxidases e pela ativação enzimática das redutases do citocromo P450 (Redza-Dutordoir; Averill-Bates, 2016).

Nas mitocôndrias, a principal ERO produzida é o ânion superóxido (O_2^-), gerado pela redução parcial do O_2 e convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelas enzimas Mn-SOD

na matriz e Cu,Zn-SOD no espaço intermembranas (Kowaltowski *et al.*, 2009). O O₂⁻ pode gerar espécies altamente reativas, como OH• e peroxinitrito, ao reagir com metais de transição ou NO•, é essencial manter sua concentração minimizada (Turrens, 2003).

Em concentrações moderadas, as EROs desempenham papéis cruciais em diversas funções celulares, como sinalização e regulação de processos fisiológicos (Birben *et al.*, 2012). Para controlar sua produção e proteger as células contra possíveis danos, o organismo conta com um sistema antioxidante eficiente (Amini *et al.*, 2021). Entretanto, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção excessiva de espécies reativas e a capacidade de defesa antioxidante, esse sistema torna-se insuficiente, caracterizando o estado de estresse oxidativo. Nessa condição, a perda da eficácia das defesas antioxidantes contribui para o desencadeamento de doenças inflamatórias e metabólicas, comprometendo a homeostase celular e tecidual (Al-Qaraleh *et al.*, 2022).

Evidências indicam que o estresse oxidativo aumenta em mulheres na menopausa, devido à redução nos níveis de estrogênio (Iantomasi *et al.*, 2023). O estrogênio apresenta uma correlação positiva com a expressão de enzimas antioxidantes e uma correlação negativa com os produtos resultantes do estresse oxidativo (Bellanti *et al.*, 2013a). Presume-se que o efeito antioxidante do estrogênio esteja relacionado à inibição da 8-hidroxilação das bases de guanina no DNA, contribuindo para a proteção contra danos oxidativos (Bourgonje *et al.*, 2020).

Um estudo realizado em 2020, na Cidade do México, comparou dois grupos de mulheres: o primeiro grupo consistia de mulheres entre 20 e 30 anos com ciclos menstruais regulares, enquanto o segundo incluía mulheres entre 50 e 60 anos na menopausa. Os resultados demonstraram que as mulheres do segundo grupo apresentaram níveis significativamente mais elevados de marcadores de estresse oxidativo em comparação às do primeiro (Montoya-Estrada *et al.*, 2020). Esses achados são consistentes com os de Heravi *et al.*, (2022), que também identificaram maiores níveis de estresse oxidativo em mulheres pós-menopáusicas em relação às pré-menopáusicas, utilizando concentrações urinárias de isoprostanos (iPF₂α-III-M) como marcadores do estresse oxidativo.

Adicionalmente, um estudo mais recente de Ishikawa e colaboradores, realizado em 2023 com mulheres japonesas na pré e pós-menopausa, investigou o efeito do estrogênio no estresse oxidativo. Foi relatado que os níveis de marcadores de estresse oxidativo e indicadores de proteínas antioxidantes eram significativamente mais elevados em mulheres na pós-menopausa em comparação com aquelas na pré-menopausa (Ishikawa *et al.*, 2023).

Os rins, órgãos centrais do sistema urinário, são vulneráveis à toxicidade sistêmica e ao estresse oxidativo, tornando-se suscetíveis a danos relacionados à menopausa (Putti, *et al.*,

2019). Conforme relatado, a ovariectomia é capaz de induzir um aumento nos níveis de peroxidação lipídica, associado ao estresse oxidativo, nos sistemas renal e hepático de camundongos. Além de reduzir a atividade antioxidante das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e os níveis de glutathiona (GSH) (Enli; Öztekin; Pinarbasili, 2009). O mesmo perfil foi relatado previamente, sendo descritas melhorias principalmente no tecido renal, após os animais passarem por treinamento físico (Silva, *et al.*, 2019).

Geralmente o fígado não produz muitas espécies reativas de oxigênio, devido à grande capacidade das enzimas antioxidantes presentes nos hepatócitos, além de contar com altas concentrações de glutathiona, antioxidantes lipídicos como a vitamina E e proteínas que ligam o ferro redox-ativo, assegurando proteção contra danos oxidativos (Jaeschke; Ramachandran, 2011). Entretanto, com o envelhecimento, enzimas como a SOD e as glutathiona S-transferases ficam reduzidas, fora isso também há uma redução nas funções das ATPases Na^+/K^+ e Ca^{2+} , podendo comprometer as funções hepáticas e levar ao surgimento de doenças (Brady, 2015).

Por fim, a redução nos níveis de estrogênio também impacta negativamente o tecido muscular, sendo a sarcopenia um dos principais problemas associados. Essa condição, caracterizada pela diminuição da massa muscular, foi evidenciada no estudo de Zacarías-Flores e colaboradores, que observaram uma redução significativa na massa muscular e perda de força em 45% das mulheres pós-menopáusicas avaliadas, associando o quadro a uma resposta antioxidante ineficaz (Zacarías-Flores *et al.*, 2018). Em níveis hormonais normais, devido a exposição das células a esses radicais livres e aos danos causados por eles, há uma indução de reações e diversos mecanismos de defesa, a fim de prevenir, reparar e inativar esses radicais gerados (Mirończuk-Chodakowska; Witkowska; Zujko, 2018).

2.3 Antioxidantes

Os antioxidantes biológicos podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos. Os não enzimáticos, por sua vez, são subdivididos em endógenos e exógenos, além dos antioxidantes sintéticos, que atuam principalmente por meio da transferência de átomo de hidrogênio, elétron único e quelação de metais (Kotha *et al.*, 2022). O sistema antioxidante enzimático é composto pela interação de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GRd) (Flieger, J. *et al.*, 2021).

A SOD é a principal enzima antioxidante, catalisando a redução do superóxido, altamente reativo, em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em humanos, existem três formas de SOD: Cu/Zn-SOD citosólica, Mn-SOD mitocondrial e SOD extracelular (EC-SOD) (Matés,

1999). A catalase, por sua vez, é a segunda enzima produzida em maior quantidade nas células, com um peso molecular de 250 kDa, atuando na decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio molecular (O_2) e água (H_2O) (Hadwan, 2018). Por fim, existem oito tipos diferentes de glutathione peroxidase (GPX), como GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX5, GPX6, GPX7 e GPX8, que, assim como a catalase, são responsáveis pela redução de H_2O_2 , em água e álcoois (Pei *et al.*, 2023). Essas enzimas criam uma ligação dissulfeto entre duas moléculas de GSH, formando a glutathione oxidada (GSSG). Por outro lado, a glutathione reductase estimula a formação de GSH a partir da GSSG (Jefferies *et al.*, 2003).

Algumas substâncias antioxidantes não enzimáticas são produzidas pelo próprio organismo (endógenas), enquanto a maioria é obtida por meio da dieta, sendo derivadas de minerais ou plantas (exógenas) (Flieger, J. *et al.*, 2021). Os principais antioxidantes endógenos incluem proteínas de ligação a metais (MBPs), glutathione (GSH), ácido úrico (UA), melatonina (MEL), bilirrubina (BIL) e poliaminas (PAs) (Mirończuk-Chodakowska; Witkowska; Zujko, 2018). Os antioxidantes exógenos, provenientes da alimentação, como vitaminas, carotenoides, polifenóis, flavonoides e bioflavonoides, complementam as defesas naturais do organismo (Kotha *et al.*, 2022). As vitaminas A, C e E, por exemplo, são capazes de manter a homeostase eliminando os radicais livres ao doar elétrons (Chaudhary *et al.*, 2023). O metabolismo do selênio e da vitamina E está interconectado, sendo o selênio fundamental para o armazenamento da vitamina E. Além disso, a deficiência de selênio no organismo pode resultar em um aumento na produção de radicais livres (Chaudhary *et al.*, 2023).

Em relação aos antioxidantes sintéticos, sabe-se que existem divergências em relação a sua eficácia em humanos, sendo que um estudo de revisão sistemática realizado por Stoia e Oancea (2022) lista os principais antioxidantes sintéticos aprovados, e destacam que o interesse por esses antioxidantes tem diminuído por razões de saúde e segurança. No referido estudo, os autores destacam a necessidade da descoberta de novos antioxidantes naturais, considerando que são mais seguros do que os sintéticos (Stoia; Oancea, 2022). De modo geral, os antioxidantes têm despertado grande interesse, principalmente os fitoquímicos naturais (Kotha *et al.*, 2022), decorrente de seu grande potencial terapêutico e capacidade de atuar sobre diversos mecanismos moleculares relacionados ao estresse oxidativo, a fim de propor uma nova abordagem para a prevenção de doenças, principalmente relacionadas com o envelhecimento (Yang, J. *et al.*, 2024).

2.4 Osteoporose

A saúde óssea é fundamental para todas as pessoas, uma vez que os ossos desempenham funções essenciais, como permitir a locomoção, oferecer suporte estrutural, proteger órgãos vitais e armazenar minerais, especialmente cálcio e fósforo (Davan *et al.*, 2023). A osteoporose, um dos principais distúrbios metabólicos ósseos, resulta do desequilíbrio no remodelamento ósseo, caracterizando-se pela redução da densidade mineral óssea (DMO) e pela diminuição da resistência óssea (Luo, H. *et al.*, 2025). É uma doença inicialmente indolor e silenciosa, que muitas vezes só é diagnosticada após a ocorrência da primeira fratura (Huyut; Bakan; Yildirim, 2021). A absorciometria por raios-X de dupla energia (DXA) é amplamente reconhecida como o método padrão-ouro para a avaliação da densidade mineral óssea (DMO), e pode ser diagnosticada quando a DMO está 2,5 desvios-padrão (DP) ou mais abaixo da média de mulheres jovens adultas nas regiões da coluna, quadril ou punho (Xiao *et al.*, 2022).

Nas mulheres, a deficiência de estrogênio associada à menopausa é o principal fator desencadeador da osteoporose, cujas fraturas por fragilidade ocorrem sobretudo no quadril e na coluna vertebral — com maior risco de mortalidade —, mas também podem acometer o úmero proximal, o punho, as costelas, os ramos isquiopúbicos e o tornozelo (Cheng; Chen, L. R.; Chen, K. H., 2022). Foi demonstrado em modelo de ovariectomia com roedores, que a perda da função ovariana pode estar relacionada a uma inflamação sistêmica crônica (Abildgaard *et al.*, 2020). Sugere-se que mulheres pós-menopausa apresentam elevados níveis de citocinas, como por exemplo a interleucina 1 β , IL6 e fatores de necrose tumorais alfa (TNF α), tanto para células do sangue quanto diretamente dentro do osso (Fischer; Haffner-Luntzer, 2022).

A matriz óssea é composta por uma parte orgânica, rica em colágeno tipo I e proteínas não colágenas, e uma parte inorgânica, formada por cristais de hidroxiapatita, cálcio, fósforo e água (Davan *et al.*, 2023). A remodelação óssea é o processo pelo qual o osso é renovado para manter sua forma, qualidade e tamanho, envolve a coordenação entre osteoclastos e osteoblastos, organizados em unidades multicelulares ósseas (BMU), seguindo uma sequência de eventos de ativação, reabsorção e formação (Hadjidakis; Androulakis, 2006). Durante a osteoporose pós-menopausa, a reabsorção óssea pode aumentar até 70% (Fischer; Haffner-Luntzer, 2022).

Inicialmente, os osteoblastos secretam colágeno não mineralizado com fosfatase alcalina, promovendo a deposição de cálcio e fósforo na matriz óssea ao longo das fibras de colágeno, sendo posteriormente rodeados por camadas mineralizadas, tornando-se osteócitos, reguladores da homeostase óssea, ajustando a formação e reabsorção óssea (Koons; Diba;

Mikos, 2020). Somado a isso, os osteoblastos também modulam a diferenciação de monócitos em osteoclastos por meio da liberação de osteoprotegerina (OPG), do ligante do receptor ativador de NF- κ B (RANKL) e do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) (Tobeiha *et al.*, 2020). Os osteoclastos são macrófagos multinucleados específicos do tecido ósseo, que atuam na superfície ou próximo ao osso (Luo, H. *et al.*, 2025).

Na década de 1990, o sistema RANKL/RANK/OPG, foi descoberto como regulador da reabsorção óssea (Boyce; Xing, 2008). O RANKL, expresso por osteoblastos, liga-se ao receptor RANK nas células precursoras de osteoclastos, promovendo sua diferenciação em osteoclastos maduros responsáveis pela reabsorção óssea por meio da liberação de ácidos e enzimas líticas; a osteoprotegerina (OPG), também produzida por osteoblastos, atua como receptor isca com maior afinidade pelo RANKL, inibindo sua interação com o RANK e prevenindo a reabsorção óssea excessiva (Infante *et al.*, 2019).

O estrogênio desempenha um papel significativo no crescimento e na manutenção da homeostase óssea (Mohamad; Ima-Nirwana; Chin, 2020), pois atua, principalmente, por meio do receptor de estrogênio alfa (ER α) nas células ósseas (Anagnostis *et al.*, 2021). Esse hormônio evita a reabsorção óssea ao suprimir a expressão de RANKL via ER α em células do revestimento ósseo, além de aumentar a expressão de OPG, principal mecanismo, que inibe a osteoclastogênese (Anagnostis *et al.*, 2021). Camundongos com deficiência de ER α em osteoblastos apresentaram redução na massa óssea e resistência, indicando que o estrogênio age diretamente nos osteoblastos para exercer seus efeitos protetores no esqueleto (Mohamad; Ima-Nirwana; Chin, 2020). A falta desse hormônio causada pela menopausa, altera a expressão dos genes-alvo, promovendo o aumento da secreção de IL-1, IL-6 e TNF, além de afetar a diferenciação celular e a apoptose, resultando em maior reabsorção óssea e contribuindo para a osteoporose (Cheng; Chen, L. R.; Chen, K. H., 2022).

Atualmente a primeira linha de tratamento para doenças ósseas são os bisfosfonatos, como alendronato, risedronato e ácido zoledrônico, são eficazes no tratamento da osteoporose pós-menopausa, porém podem causar efeitos colaterais no trato gastrointestinal (Cheng; Chen, L. R.; Chen, K. H., 2022). Moduladores seletivos do receptor de estrogênio como o raloxifeno apresentaram efeitos colaterais como sangramento vaginal, acidente vascular encefálico (AVE) e câncer de mama, enquanto a Teriparatida exige administração diária e alto custo (Davan *et al.*, 2023). Estudos com mulheres da menopausa envolvendo a suplementação com vitamina D não obtiveram efeitos significativos, além de comprovarem que doses elevadas aumentam os riscos de fraturas (Yong, Eu-Leong; Logan, 2021).

A terapia mais utilizada para osteoporose é a reposição estrogênica exógena para prevenir a perda óssea, porém seu uso prolongado é limitado pelas evidências de aumento no risco de câncer de mama, AVC e doenças cardiovasculares (Song *et al.*, 2022). Assim, o alto custo e os efeitos colaterais das terapias atuais reforçam a necessidade de tratamentos com menores efeitos colaterais, sendo sugeridos produtos naturais como alternativa mais segura (Davan *et al.*, 2023).

2.5 Modelo de menopausa - Ovariectomia

O modelo animal mais utilizado para estudar as condições associadas a menopausa é gerado em camundongos (Komori, 2015). Nesses animais, a maturidade reprodutiva ocorre por volta das cinco semanas de idade (Ottinger *et al.*, 2005). Seu ciclo reprodutivo é estral, com duração aproximada de 4 a 5 dias e dividido em quatro fases (proestro, estro, metaestro e diestro), nas quais o revestimento uterino é reabsorvido em vez de eliminado, apresentando variações hormonais semelhantes às do ciclo menstrual humano (Koebele; Bimonte-Nelson, 2016).

Diferentemente das mulheres, os camundongos não apresentam falência ovariana na meia-idade, por isso recorre-se a ovariectomia (Kermath; Gore, 2012). Este procedimento consiste na remoção cirúrgica dos ovários, (Souza *et al.*, 2019), induzindo uma condição de hipoenestrogenismo que reproduz as principais características da menopausa humana, como perfil hormonal semelhante, desregulação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas e alterações cognitivas e cardiometabólicas (Medina-Contreras *et al.*, 2020).

A ovariectomia destaca-se por sua fácil execução, baixo custo e perda abrupta dos hormônios ovarianos (Medina-Contreras *et al.*, 2020). Atualmente, é considerado o modelo mais adequado para investigar os efeitos da privação hormonal e de terapias exógenas, fornecendo subsídios para a compreensão da perda hormonal gonadal e para o desenvolvimento de estratégias que promovam a qualidade de vida das mulheres na fase pós-reprodutiva (Koebele; Bimonte-Nelson, 2016).

2.6 Ácido Húmico (AH)

Entre os materiais orgânicos de maior distribuição no planeta, se destacam as substâncias húmicas (Sutton, 2005), formadas naturalmente a partir da decomposição de plantas e resíduos microbianos, por meio de reações químicas e processos físicos (Sarlaki *et al.*, 2019).

Distribuídos em solos, rios, oceanos e recursos naturais relacionados ao carvão, como a turfa, leonardita e linhito (Jung, 2021). Essas substâncias são constituídas por compostos de baixa massa molecular, possuem domínios hidrofílicos (ácidos fúlvicos) ou hidrofílico-hidrofóbicos (ácidos húmicos), sendo separadas por extratores alcalinos que solubilizam ambas as frações, enquanto a acidificação precipita apenas os ácidos húmicos, restando as huminas como a fração insolúvel (Baldotto, M. A.; Baldotto, L. E. B., 2014). As moléculas de ácido fúlvico, apresentam estruturas aromáticas e alifáticas com grupos funcionais oxigenados (—COOH e —OH), que ao serem protonados ou desprotonados no pH natural das águas conferem-lhe comportamento de polieletrólito (Saar, 1982). Diferentemente dos ácidos húmicos, os ácidos fúlvicos são solúveis em todos os pHs, possuem baixo peso molecular, alto teor de oxigênio, além de apresentarem coloração amarelada (Winkler, 2018).

As substâncias húmicas também podem ser obtidos por meio do processo de vermicompostagem (Antunes *et al.*, 2015). A vermicompostagem converte resíduos biodegradáveis como os de origem agrícola, doméstica, comercial, agroindustrial e da criação animal, em vermicomposto nutritivo. Esse processo ocorre por meio da ação biológica das minhocas, que digerem os resíduos e os transformam em excretas com abundância de nutrientes (Adhikary, 2012). O processo se mostra mais eficiente que a compostagem convencional, já que, ao atravessar o intestino das minhocas, o material sofre transformações que geram excrementos altamente ricos em atividade microbiana (Adhikary, 2012). Além disso, levando em consideração de que existe um grande desperdício de alimentos, resultando em impactos socioambientais, a técnica de vermicompostagem se torna uma alternativa sustentável de reciclagem da matéria orgânica, evitando a degradação ambiental (Sena, 2019).

Os Ácidos Húmicos (AH) possuem uma estrutura altamente complexa, enriquecida por grupos funcionais fenólicos, hidroxila, cetona, quinona, semiquinona, carboxila, carbonila e alcóxi (Vašková *et al.*, 2011). Por não apresentarem composição estequiométrica usual nem estrutura regular, os ácidos húmicos se destacam pela heterogeneidade estrutural e polidispersidade, sendo de difícil análise devido às características que variam conforme o tipo de matéria-prima e o método de extração utilizado (Trofimova *et al.*, 2017). Por esse motivo, é clinicamente relevante tratar o ácido húmico como um gênero molecular, e não como uma molécula fixa com fórmula estática, pois sua química e potencial clínico são influenciados pela fauna local, microambientes e fatores temporais, embora seus constituintes básicos sejam bem definidos (Socol, 2023).

A estrutura dos AH lhes confere propriedades úteis, incluindo quelação de íons metálicos, atividade antioxidante, anti-inflamatória e comportamento redox. (Venezia *et al.*,

2022). Portanto, o uso dessa molécula tem sido explorado e utilizado no tratamento de diversas doenças (Socol, 2023). Mitra e colaboradores avaliaram os efeitos pró-apoptóticos e anti-melanogênicos dos AH em cultivo celular de melanoma humano, e notaram que, nos grupos tratados, não houve progressão do ciclo celular, além de ativarem mecanismos de apoptose (SalehI *et al.*, 2022).

A fim de avaliar as características antibacterianas dos AH, pesquisadores relataram uma melhora na cicatrização de feridas no palato de ratos, comparando com o tratamento comumente utilizado, gluconato de clorexidina (Çalışir *et al.*, 2018). Os AH também demonstraram propriedades antiinflamatórias, reduzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias, além de mitigar lesões hepáticas induzidas por aflatoxinas, em ratos (Xu, P. *et al.*, 2023). Resultados que apoiam os achados de Rusliandi e colaboradores e Jiazhang e colaboradores, que também demonstraram o potencial anti-inflamatório dos AH, desta vez em feridas induzidas na pata (Rusliandi; Rousdy; Mukarlina, 2020) e em colite induzida por sulfato de dextrana, em ratos, respectivamente (Huang *et al.*, 2023).

Por fim, mais uma vez demonstrando o potencial efeito dos AH em diversos tipos de doenças, um estudo publicado recentemente, utilizando AH derivados de vermicompostagem, comprovou que essas substâncias são capazes de atuar melhorando parâmetros de estresse oxidativo, além de amenizar a perda óssea em ratos com doença periodontal (Giordano *et al.*, 2025). Tendo em vista que tanto a periodontite quanto a osteoporose apresentam mecanismos fisiopatológicos em comum, como o desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, e pelo aumento de citocinas inflamatórias, supõe-se que os ácidos húmicos também apresentem potencial terapêutico para melhorar a qualidade óssea em modelo experimental de deficiência estrogênica (Wang, 2016).





SEGUNDA PARTE: Artigo publicado no periódico *Biomedicines* em 17 de Fevereiro de 2025 (Fator de Impacto: 3.9)



biomedicines

Article

Humic Acid Derived from Vermicompost Improves Bone Mineral Content and Alters Oxidative Stress Markers in Ovariectomized Mice

Thays Cristina dos Santos ¹, Hellen Paulo Silva ¹, Karen Rodrigues Lima ¹, Maria Luiza Nonato Salvador ¹, Geraldo de Sousa Cândido ¹, Laura Cristina Jardim Pôrto Pimenta ¹, Natália Oliveira Bertolini ², Luciana Botelho Ribeiro ¹, Filipe Gomes Fagundes ³, Débora Ribeiro Orlando ¹, Bruno Del Bianco Borges ¹, Marco Fabrício Dias-Peixoto ⁴, Alan Rodrigues Teixeira Machado ³, Leonardo Barros Dobbss ⁵, Luciano José Pereira ¹ and Eric Francelino Andrade

¹Faculty of Health Sciences, Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras 37200-000, Minas Gerais, Brazil; thays.santos1@estudante.ufla.br (T.C.d.S.); hellen.silva7@estudante.ufla.br (H.P.S.);

karen.lima1@estudante.ufla.br (K.R.L.); maria.salvador@estudante.ufla.br (M.L.N.S.);

geraldocandido@ufla.br (G.d.S.C.); laurap@ufla.br (L.C.J.P.P.); lulu_bribeiro@hotmail.com (L.B.R.);

debora.orlando@ufla.br (D.R.O.); bruno.borges@ufla.br (B.D.B.B.); lucianojosepereira@ufla.br (L.J.P.)

²Department of Physical Education, University Center of Lavras (UNILAVRAS),

Lavras 37200-000, Minas Gerais, Brazil; natioliveira.ef@gmail.com

³Department of Exact Sciences, Universidade do Estado de Minas Gerais,

João Monlevade 35930-314, Minas Gerais, Brazil; fgfagundes@gmail.com (F.G.F.);

alan.machado@uemg.br (A.R.T.M.)

⁴Postgraduate Program in Health Sciences (PPGCS), Federal University of the Jequitinhonha and

Mucuri Valleys (UFVJM), Diamantina 39803-371, Minas Gerais, Brazil; marcofabri@ufvjm.edu.br

⁵Institute of Agrarian Sciences, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM),

Unaí 38610-000, Minas Gerais, Brazil; leonardo.dobbss@ufvjm.edu.br

*Correspondence: eric.andrade@ufla.br or ericfrancelinoandrade@gmail.com

Abstract: Background: Estrogen depletion alters bone mineralization and oxidative stress. Antioxidants like humic acids (HA) may help mitigate bone demineralization and redox imbalances. Thus, this study evaluated the effects of HA on bone mineral composition and oxidative stress markers in an experimental menopause model. **Methods:** Twenty-four female C57BL/6 mice were divided into four groups (n = 6/group): Sham; Sham + HA; Ovariectomized (OVX); and OVX + HA. The menopause model was induced by bilateral ovariectomy at the beginning of the experiment. HA derived from biomass vermicompost was administered daily by gavage for 28 days. After euthanasia, femurs and fragments of the gastrocnemius muscle, liver, and kidney were collected. Bone elemental composition was analyzed using scanning electron microscopy (SEM) coupled with energy dispersive spectroscopy (EDS). Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and hydrogen peroxide (H₂O₂) activities were assessed in muscle, renal, and hepatic tissues. Data were analyzed using two-way ANOVA and Bonferroni's post hoc test. **Results:** Untreated OVX mice exhibited a significant reduction in femoral calcium content ($p < 0.05$). However, HA treatment increased calcium levels and improved the Ca/P ratio ($p < 0.05$). H₂O₂ activity was reduced in the liver and kidney of OVX + HA mice compared to untreated animals

($p < 0.05$). CAT activity in muscle increased in the OVX + HA group compared to the OVX ($p < 0.05$). **Conclusions:** HA treatment improved femoral elemental composition and modulated oxidative stress markers in an experimental menopause model.

Keywords: menopause; estrogen depletion; humic substances; bone; natural products

1. Introduction

The climacteric is characterized by the gradual depletion of ovarian follicles, resulting in a reduction in estrogen production and ultimately leading to menopause [1]. While this phase is a natural transition in the female organism, it increases the risk of various health conditions, including coronary heart disease, Alzheimer's disease, metabolic disorders, and osteoporosis [2]. Menopause-related osteoporosis is defined by the deterioration of bone microarchitecture and a reduction in bone mass, which leads to increased fragility and a higher susceptibility to fractures [3]. Moreover, estrogen deficiency during menopause increases oxidative stress, characterized by an imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS) and the cell's antioxidant defense mechanisms [4].

Due to hormonal factors, women with estrogen reduction are 1.5 times more likely to develop osteopenia/osteoporosis [5,6]. It is estimated that one in three women over the age of 50 will experience fractures related to this condition [5,6]. In 2019, the global incidence of osteoporosis was estimated at 41.5 million cases, with projections suggesting that more than 263.2 million people will be affected by the disease between 2030 and 2034 [7]. Additionally, the prevalence of osteoporosis is notably higher in low-income countries, where the substantial cost of treatment poses a significant challenge to public health systems [5,8].

Estrogen hormone therapy has been utilized in the treatment of menopausal patients to mitigate bone alterations caused by estrogen deficiency [9]. However, this form of replacement therapy has been associated with an increased risk of certain types of cancer, particularly breast and endometrial cancer [10,11]. Consequently, the search for novel therapies with fewer side effects and greater efficacy for preventing or treating menopause-related outcomes remains a significant area of interest [12,13]. It is considered that antioxidant agents can regulate bone remodeling and mitigate the loss of bone mineral density in osteoporosis [14]. Additionally, natural products with antioxidant activity may reduce oxidative damage and enhance the activity of antioxidant enzymes in metabolically active tissues [15,16]. Accordingly, humic acids (HA) are among the compounds highlighted for their potential to attenuate bone resorption [17].

HA are macromolecules primarily found in soils, rivers, oceans, and coal [18]. These compounds are naturally formed through chemical and physical reactions involving microbial residues and plant decomposition [19]. Additionally, HA can also be obtained through vermicomposting, a process in which organic matter undergoes aerobic decomposition facilitated by earthworms [20]. This process potentially enhances the biological activity of the resulting material [21]. Due to their antibacterial, anti-inflammatory, and antioxidant properties [22], the effects of HA have been investigated in both animal and human health, yielding promising results [17,23,24]. The administration of HA in experimental models has demonstrated their potential as wound-healing agents [25]. Additionally, these compounds have shown beneficial effects in the treatment of colitis, attributed to their role in modulating the gut microbiota [26], as well as an ability to improve the inflammatory profile in periodontitis models [27–

29].

In recent studies conducted by our group, we observed that animals with ligature-induced periodontitis treated with HAs showed improvements in the mineral composition of alveolar bone and, consequently, exhibited reduced alveolar bone loss [17,29]. Given that both periodontitis and osteoporosis share similar mechanisms that promote bone resorption [30,31], it is plausible that agents capable of attenuating alveolar bone loss in periodontitis could also yield improvements in bone tissue affected by osteopenia/osteoporosis. To date, no studies have evaluated the effects of HA treatment on conditions associated with estrogen deficiency, such as osteopenia/osteoporosis. Therefore, we aimed to investigate the effects of HA treatment on bone elemental composition and oxidative stress parameters in an experimental model of ovariectomy-induced bone loss.

2. Materials and Methods

This study was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Lavras (CEUA/UFLA—protocol 3643011123). All procedures were conducted following the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and ARRIVE guidelines. The *in vivo* study was conducted between August and September of 2024.

2.1. Composting, Vermicomposting, Extraction, and Characterization of Humic Acids (HA)

Residues from soybean (*Glycine max* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), coarsely chopped, as well as corn grain flour (*Zea mays* L.) and crushed sugarcane bagasse (*Saccharum officinarum* L.) were composted for 30 days. The process included mechanical turning every 10 days. Subsequently, earthworms (*Eisenia foetida*) were added at a density of 50 per kilogram of organic material to initiate the composting process, which lasted approximately three months (95 days). Humidity, temperature, pH, and aeration parameters were monitored every three days. At the end of the process, the vermicompost was dried in an oven at 60 °C for 48 h, sieved through a 4 mm mesh, and used for the extraction of HA. The extraction process began by treating the vermicompost with a 0.1 mol L⁻¹ NaOH solution in a ratio of 1:10 (m/v) for four hours under agitation. After this period, the material was centrifuged (15 min at 5000 g) to separate the humic substances (humic acids — HAs + fulvic acids — FAs) from the humins (the insoluble fraction of organic matter). To separate the HAs from the FAs, the pH of the humic substances was reduced to between 1.0 and 1.5 by adding 6 mol L⁻¹ HCl. At this pH, the HAs precipitated and were subsequently separated and washed with distilled water until a negative test for the presence of chloride was confirmed using silver nitrate (AgNO₃). After washing, the HAs were titrated to a pH of 7.0 using 0.01 mol L⁻¹ KOH and then placed in membranes with a molecular weight cut-off of 1000 Da and dialyzed against distilled water until the electrical conductivity (EC) of the system reached equilibrium. Following dialysis, the HAs were frozen and lyophilized for later use. The characterization of the HAs used in the present study has been described in previous studies conducted by our group [17,29,32].

2.2 Animals

Twenty-four healthy female C57BL/6 mice, aged 12 weeks and with an initial body weight of 20.8 ± 0.8 g, were used in this study. The animals were obtained from the NUCAL—Laboratory Animal Breeding Center (Universidade Federal de São João del Rey, Minas Gerais, Brazil). Throughout the experiment, the mice were housed in an experimental room under controlled conditions, including a temperature of 22 ± 2

°C, humidity of $45 \pm 15\%$, and a 12 h light/dark cycle. Rodents were kept in polyethylene cages lined with wood shavings and provided with rodent chow (Nuvilab[®]) and water ad libitum for the entire experimental period.

2.2. Experimental Design

We performed a sample size calculation to ensure that the minimum number of animals required to achieve statistical significance ($p < 0.05$) with 80% power was met. A minimum of five animals per group was necessary based on a large effect size (partial $\eta^2 > 0.14$) and test power exceeding 80% for the treatment effect. The experiment followed a completely randomized design. Mice were randomly assigned to one of four groups ($n = 6$ animals/group): sham-operated group treated with saline (Sham), ovariectomized group treated with saline (OVX), sham-operated group treated with HA (Sham + HA), and ovariectomized group treated with HA (OVX + HA). HA was administered at a dose of 80 mg/kg daily for 28 days, starting 2 weeks after surgical recovery. This dosage and treatment duration were determined based on previous studies conducted by our group using a periodontitis model [17,29,32]. At the end of the experiment, the animals were euthanized, and the uterus, femur, gastrocnemius muscle, liver, and kidneys were collected.

2.3. Protocol of Sham and Ovariectomy (OVX)

After a two-week acclimation period, the animals were divided into two groups: one group underwent ovariectomy (OVX, $n = 12$) and the other received a sham operation (Sham, $n = 12$). The distribution of animals between groups was randomized, and group allocation was balanced based on body weight to ensure no significant differences in initial weight between the groups. In the OVX group, both ovaries were surgically removed, as described in a previous study [33]. The same procedure was performed in the sham-operated group, but the ovaries were left intact. All procedures were carried out under anesthesia, with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg).

2.4. Administration of Humic Acids (HA)

Two weeks after the surgical procedures, the animals were randomly assigned to four experimental groups based on the treatment ($n = 6$ /group): sham-operated group treated with saline (Sham), ovariectomized group treated with saline (OVX), sham-operated group treated with HA (Sham + HA), and ovariectomized group treated with HA (OVX + HA). The HA solutions were prepared daily by dissolving the compound in saline solution. HA was administered daily by gavage for 28 days. In the Sham and OVX groups, 0.3 mL of saline solution was administered daily. At the end of the experimental period, the animals were weighed, anesthetized with intraperitoneal injections of xylazine hydrochloride (10 mg/kg) and ketamine hydrochloride (80 mg/kg), and then euthanized via cardiac puncture. After euthanasia, the uterus of the mice was weighed using an analytical balance.

2.5. Assessment of Bone Elementary Composition and Topography Using Scanning Electron Microscopy Coupled with Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM/EDS)

The left femurs were immersed in hydrogen peroxide for 12 h to facilitate the removal of the remaining soft tissues and were subsequently dried at room temperature for two weeks. To evaluate the bone microstructure and identify any morphological characteristics in the bone, each sample was placed on the surface of an aluminum support using double-sided carbon tape and analyzed via scanning electron microscopy (SEM) (Vega 3 LMU, TESCAN, Brno-Kohoutovice, Czech Republic). Assessments were conducted on the distal femoral epiphysis, with images obtained at magnifications of 27 \times and 500 \times . The positioning of the samples in the

equipment and the image acquisition were consistently performed by the same researcher (FGF). We evaluated the bone topography in the images captured at 500× magnification, focusing on aspects such as porosity, irregularities, and roughness, as previously described [34].

Additionally, we evaluated the elemental composition of the bone surface, including calcium, phosphorus, and carbon, using energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS) with an X-MaxN detector (Oxford Instruments, Abingdon, United Kingdom). Spectra were acquired at an acceleration voltage of 20 kV and a working distance of 13 mm, with data analysis conducted using AZtec 3.1 software (Oxford Instruments, High Wycombe, UK) [34]. We also calculated the Ca/P, C/Ca, and C/P ratios, as described in a previous study [35].

2.6. Evaluation of the Redox Status

After euthanasia, fragments of the liver, kidney, and left gastrocnemius muscle were collected, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for the evaluation of oxidative stress markers. Each tissue sample was individually weighed and homogenized using a homogenizer (Ultra-turrax) at a ratio of 100 mg of tissue per 1 mL of $\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$ buffer. The resulting homogenate was centrifuged at 12,000 rpm for 10 min, and the supernatant from each sample was carefully collected, aliquoted, and stored at -80°C . Protein concentrations in the homogenate were quantified using the Bradford method [36]. The concentration of hydroperoxide (H_2O_2) was determined following the protocol previously described [37]. Superoxide dismutase (SOD) activity was assessed based on the enzyme's ability to inhibit the superoxide anion (O_2^-), thereby reducing the rate of pyrogallol auto-oxidation [38]. Catalase (CAT) activity was measured by the decomposition of hydrogen peroxide (H_2O_2) over one minute, with absorbance readings taken at a wavelength of 240 nm [39].

2.7. Statistical Analyses

The data underwent analysis of variance (ANOVA) with the F-test in a 2×2 factorial model (considering HA treatment and OVX as factors) to compare groups and interaction ($p < 0.05$). Bonferroni's post hoc test was conducted when the F values indicated significant interaction ($p < 0.05$). GraphPad Prism version 8.00 (v. 8, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was utilized for data analysis.

3. Results

3.1. Uterine and Body Weight

Animals in both OVX groups exhibited lower uterine weights compared to those in the Sham groups (between Sham and OVX group $p = 0.024$; between Sham + HA and OVX + HA $p = 0.025$ —Figure 1A). Conversely, body mass was higher in OVX animals compared to Sham ($p = 0.047$ —Figure 1B). No significant differences were observed in body mass between the OVX + HA group and either the OVX or Sham + HA groups ($p > 0.05$).

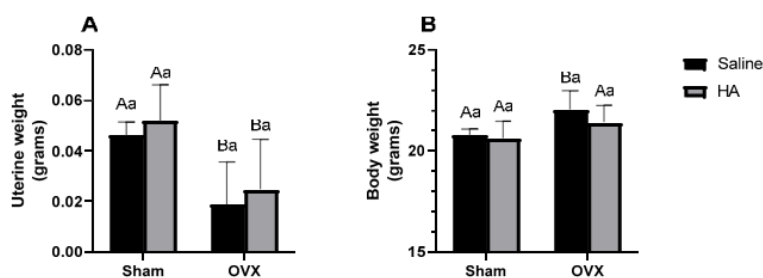


Figure 1. Uterine (A) and body weight (B) of ovariectomized (OVX) mice treated with humic acids (HA). ^{A,B} Uppercase letters denote significant differences between OVX and sham-operated groups ($p < 0.05$). ^a Lowercase letters indicate significant differences between groups treated and untreated with HA ($p < 0.05$). Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test ($n = 6$ per group).

3.2. Elemental Composition and Topography of Femur Assessed by SEM/EDS

No significant differences were observed in the topography (porosity, irregularities, and roughness) of the distal femoral epiphysis among the experimental groups (Figure 2A–E). However, elemental composition analysis revealed that calcium percentages were lower in the OVX group compared to the Sham group ($p = 0.000$ —Figure 3A). Additionally, calcium levels were higher in the OVX + HA group compared to the OVX group ($p = 0.000$ —Figure 3A). No significant differences were found in phosphorus (effect of ovariectomy $p = 0.361$; effect of HA treatment $p = 0.240$ —Figure 3B) and carbon levels (effect of ovariectomy $p = 0.743$; effect of HA treatment $p = 0.362$ —Figure 3C). The Ca/P ratio did not differ significantly between the Sham and OVX groups (between Sham and OVX group $p = 0.502$; between Sham + HA and OVX + HA $p = 0.247$); however, OVX animals showed lower values for this parameter compared to the OVX + HA group ($p = 0.020$; Figure 4A). The C/Ca ratio was higher in the OVX group compared to both the Sham and OVX + HA groups ($p < 0.003$; Figure 4B). Lastly, the C/P ratio was elevated in the OVX group compared to the Sham group ($p < 0.028$), with no significant differences observed following HA treatment ($p > 0.461$; Figure 4C).

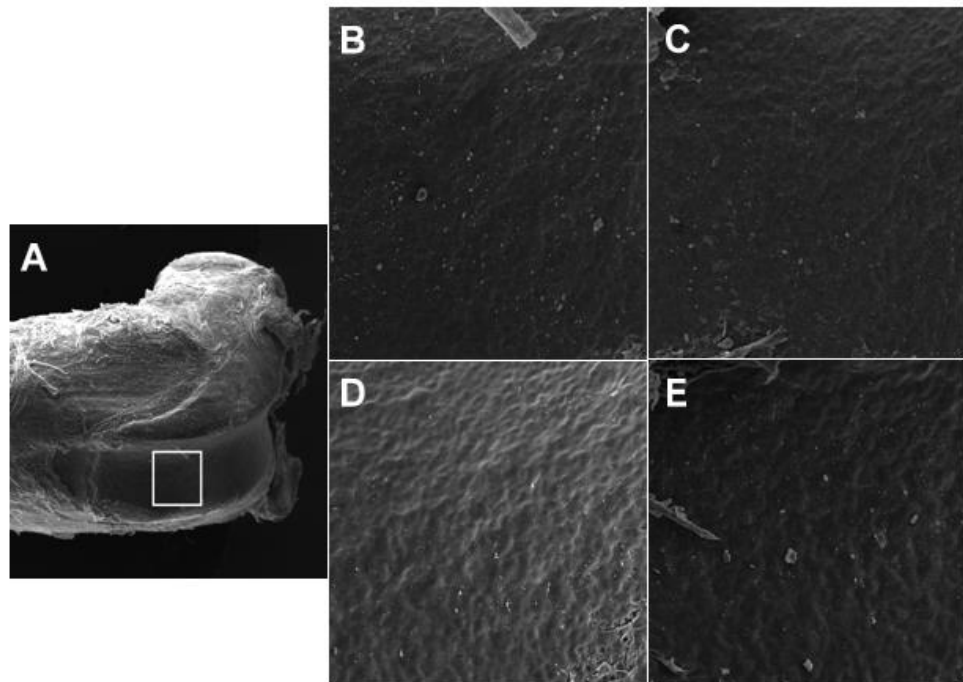


Figure 2. Representative images showing the topography of the distal femoral epiphysis in ovariectomized (OVX) mice treated with humic acids (HA). Magnification: (A)—27 \times ; (B–E)—500 \times , obtained via scanning electron microscopy (SEM). (A): The square highlights the standardized region selected for topographical evaluation. (B): Sham-operated group treated with saline (Sham). (C): Sham-operated group treated with HA (Sham + HA). (D): Ovariectomized group treated with saline (OVX). (E): Ovariectomized group treated with HA (OVX + HA).

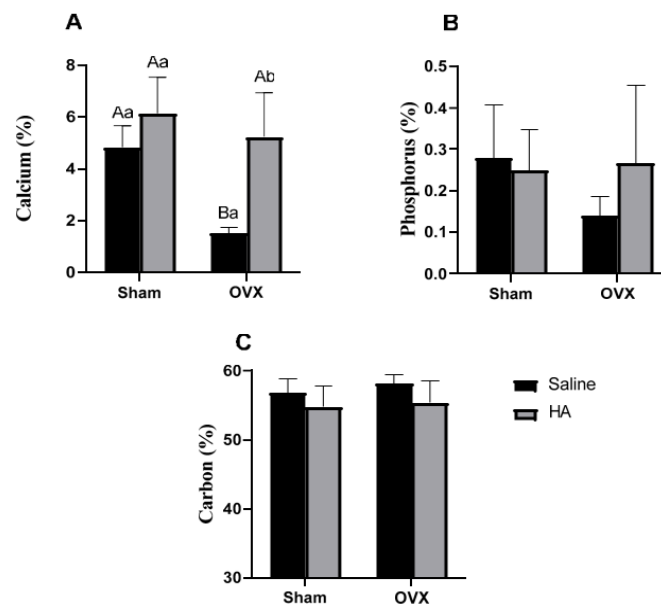


Figure 3. Elemental composition of the femoral epiphysis surface in ovariectomized (OVX) mice treated with humic acids (HA). (A): Calcium percentage in distal femoral epiphysis. (B): Phosphorus percentage in distal femoral epiphysis. (C): Carbon percentage in distal femoral epiphysis. ^{A,B} Up- percase letters denote significant differences between OVX and sham-operated groups ($p < 0.05$). ^{a,b} Lowercase letters indicate significant differences between groups treated and untreated with HA ($p < 0.05$). Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test ($n = 6$ per group).

3.3. Oxidative Stress Markers in the Gastrocnemius Muscle

SOD activity levels in the gastrocnemius muscle were higher in both OVX groups compared to the Sham groups (between Sham and OVX group $p = 0.007$; between Sham + HA and OVX + HA $p = 0.010$ —Figure 5A), with no significant effect observed from HA treatment. Conversely, CAT activity was lower in OVX animals compared to the Sham group ($p < 0.001$; Figure 5B); however, CAT activity was significantly increased in OVX groups treated with HA ($p < 0.040$; Figure 5B). No significant differences were observed in H_2O_2 activity among the groups (effect of ovariectomy $p = 0.361$; effect of HA treatment $p = 0.240$ — Figure 5C).

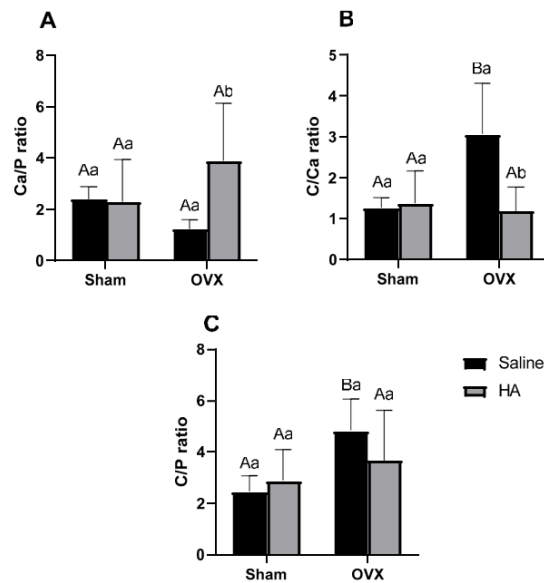


Figure 4. Ca/P (A), C/Ca (B), and C/P (C) ratios of the femoral epiphysis surface in ovariectomized (OVX) mice treated with humic acids. (HA). ^{A,B} Uppercase letters denote significant differences between OVX and sham-operated groups ($p < 0.05$). ^{a,b} Lowercase letters indicate significant differences between groups treated and untreated with HA ($p < 0.05$). Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni post hoc test ($n = 6$ per group).

3.4. Oxidative Stress Markers in the Liver

No significant differences were observed in hepatic SOD activity among the groups (effect of ovariectomy $p = 0.361$; effect of HA treatment $p = 0.240$ —Figure 6A). Hepatic CAT activity was higher in OVX animals compared to both the Sham ($p = 0.005$) and OVX + HA groups ($p = 0.018$; Figure 6B). H_2O_2 levels were reduced in the OVX + HA group compared to the untreated OVX animals ($p < 0.003$; Figure 6C), with no significant differences observed between the other groups.

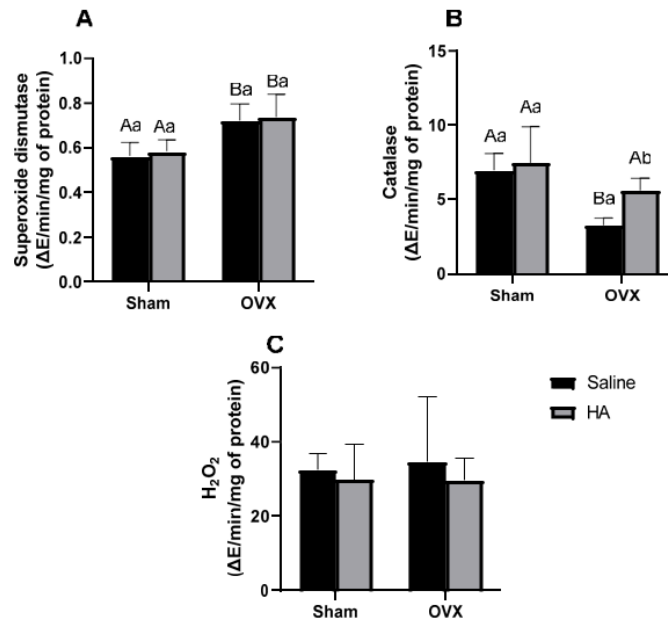


Figure 5. Oxidative stress markers in the gastrocnemius muscle of ovariectomized (OVX) mice treated with humic acids (HA). (A): Superoxide dismutase (B): Catalase. (C): H₂O₂. ^{A,B} Uppercase letters denote significant differences between OVX and sham-operated groups ($p < 0.05$). ^{a,b} Lowercase letters indicate significant differences between groups treated and untreated with HA ($p < 0.05$). Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test ($n = 6$ per group).

3.5. Oxidative Stress Markers in the Kidney

SOD activity in the kidneys was reduced in the Sham group treated with HA compared to the untreated Sham group ($p = 0.003$; Figure 7A), with no significant differences observed between the other groups. Renal CAT activity did not differ across treatments (effect of ovariectomy $p = 0.739$; effect of HA treatment $p = 0.253$ —Figure 7B). H₂O₂ levels were lower in the OVX group treated with HA compared to the untreated OVX group ($p = 0.014$; Figure 7C), with no significant differences observed among the other groups.

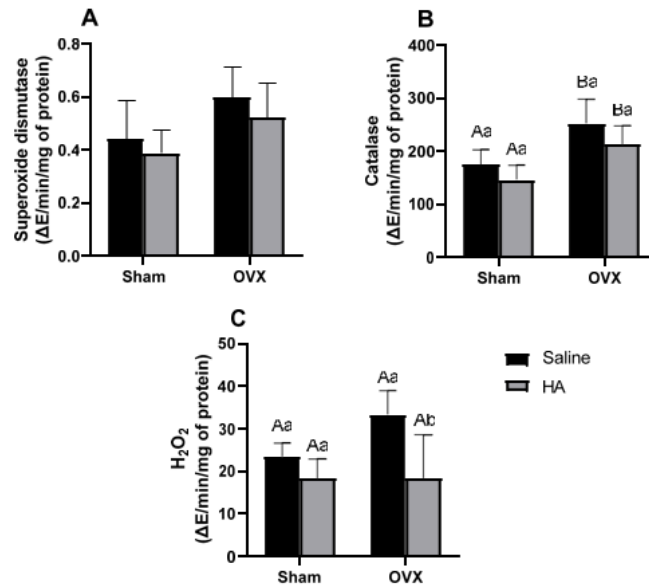


Figure 6. Oxidative stress markers in the liver of ovariectomized (OVX) mice treated with humic acids (HA). (A): Superoxide dismutase (B): Catalase. (C): H_2O_2 . ^{A,B} Uppercase letters denote significant differences between OVX and sham-operated groups ($p < 0.05$). ^{a,b} Lowercase letters indicate significant differences between groups treated and untreated with HA ($p < 0.05$). Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test ($n = 6$ per group).

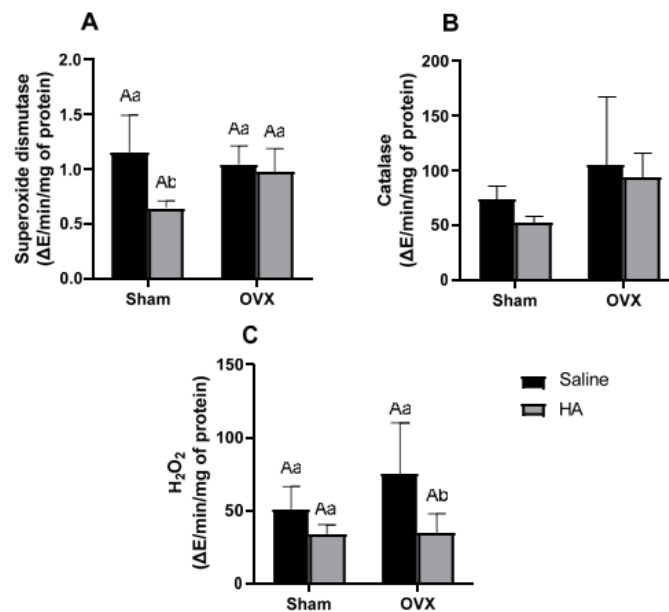


Figure 7. Oxidative stress markers in the kidney of ovariectomized (OVX) mice treated with Humic Acids (HA). (A): Superoxide dismutase (B): Catalase. (C): H_2O_2 . ^A Uppercase letters denote significant differences between OVX and sham-operated groups ($p < 0.05$). ^{a,b} Lowercase letters indicate significant differences between groups treated and untreated with HA ($p < 0.05$). Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test ($n = 6$ per group).

4. Discussion

The main findings of our study were the improvement in bone elemental composition in ovariectomized animals treated with HA compared to those untreated. Additionally, we observed that in mice induced to the menopause model, treatment with HA increased CAT activity in the gastrocnemius muscle and reduced H₂O₂ levels in both the liver and kidneys compared to untreated animals. To our knowledge, this is the first study to evaluate the effects of HA treatment in an experimental menopause model. Therefore, our pioneering findings support previous results linking the protective effects of these agents on bone [17,25,27–29] and their modulation of oxidative stress markers [40,41].

Ovariectomy is a surgical procedure used to simulate the cessation of gonadal estrogen production similar to that which occurs after menopause [42]. The absence of these hormones leads to hallmark outcomes of this condition, including reduced uterus mass and increased body weight [43]. In fact, in our study, the uterine weight of animals in both OVX groups was lower than that of the Sham groups, confirming the effectiveness of the surgery. Additionally, we observed that OVX animals had a higher body weight than the Sham group at the end of the experimental period. The increase in body mass in response to reduced circulating estrogen levels occurs because these hormones play a key role in regulating energy metabolism and appetite [44]. Furthermore, the absence of estrogens decreases the basal metabolic rate, favoring energy accumulation in body fat [45,46].

Other classic outcomes of ovariectomy include a reduction in bone mineral density [47] and alterations in oxidative stress within metabolically active tissues [48]. In our study, we observed that calcium levels in the femur of OVX animals were approximately 60% lower compared to those in the Sham group, which was statistically significant. Additionally, femoral phosphorus levels in OVX animals were about 50% lower than in the Sham group; however, this difference was not statistically significant. The deposition of minerals such as calcium and phosphorus in bone is mediated by estrogen, which inhibits osteoclast activity and, consequently, enhances osteoblast activity [49]. Therefore, with reduced levels of these hormones, osteoclast activity increases, promoting bone resorption and reducing the mineral matrix [50]. Regarding the oxidative profile, estrogen generally exerts an antioxidant effect, and its reduction can potentially increase oxidative damage in various tissues [48]. This was partially observed in our study, as evidenced by the increased H₂O₂ levels in the liver and kidney tissues of OVX animals compared to the Sham group.

Considering the detrimental effects caused by decreased estrogen levels in postmenopause, various strategies have been employed to mitigate damage to bone tissue and oxidative stress [14]. Among these agents, HA has emerged as a promising candidate due to its antioxidant properties [32] and potential to improve bone composition [17,29,51]. In our study, we observed that ovariectomized animals treated with HA exhibited higher calcium levels and an increased Ca/P ratio compared to untreated animals, with values comparable to those of the Sham group. An elevated Ca/P ratio indicates greater cortical mineralization [52]. Healthy cortical bone is characterized by slow turnover and low porosity, with its minerals being less susceptible to ionic substitution compared to trabecular bone [53]. Thus, cortical bone loss is associated with trabecularization of the endocortical surface and increased cortical porosity [53].

Another noteworthy finding in our study was the reduction in the C/Ca and C/P ratios in OVX animals treated with HA compared to untreated ones. Elevated C/Ca and C/P ratios indicate a higher protein-to-mineral content in the bone matrix [54]. Conversely, decreasing these ratios may indicate enhanced bone mineralization [35]. In

previous studies conducted by our group, we observed that the administration of HA in an experimental periodontitis model increased the Ca and P content in the mandibular alveolar bone of the animals [17,29]. The mechanisms through which HA confers protection against bone demineralization remain unclear. However, these compounds are believed to enhance intestinal absorption and mineral bioavailability [55], thereby providing more substrate for deposition in the bone [51]. Furthermore, the anti-inflammatory properties of these agents may inhibit osteoclast activation, reducing bone resorption [28]. Nonetheless, further studies are needed to elucidate the mechanisms through which HA preserves the bone mineral matrix.

Regarding the oxidative stress markers evaluated in the present study, we observed that ovariectomy altered SOD and CAT levels in the gastrocnemius muscle and increased CAT activity in the liver compared to Sham animals. This increase in CAT activity in the liver may be linked to a compensatory mechanism of this enzyme to combat excess free radicals caused by reduced estrogen levels [56]. Indeed, menopause has been reported to impair antioxidant activity [57]. Estrogen exerts an antioxidant effect, and its reduction can potentially enhance oxidative damage in various tissues [48]. This was observed in our study, as indicated by the trend toward higher H₂O₂ levels in the hepatic and renal tissues of OVX animals compared to the Sham group. However, although no significant differences in enzymatic activity were observed in the liver between Sham and OVX animals, H₂O₂ levels were reduced in OVX animals treated with HA. This protective effect of HA may be attributed to their structural characteristics, particularly the presence of quinone-like structures that enable the molecule to transfer electrons independently of mitochondrial enzymes, thereby directly neutralizing free radicals [58]. Additionally, oxidized phenolic groups that form phenoxyl radicals may also contribute to the antioxidant activity of HA [59].

HA has the potential to reduce oxidative damage by disrupting the radical chain reaction, thereby preventing harm to cell membranes and biological macromolecules. In a previous study conducted by our group, we characterized HA extracted from biomass vermicompost and identified the presence of 32% aromatic hydrogens, which play a crucial role in the antioxidant activity of this compound [32]. The quinone-like structures in HA facilitate electron acceptance and transfer, enabling the reduction of hydrogen peroxide without mitochondrial enzyme involvement [60]. Additionally, it was demonstrated that the balance between electron acceptors (quinones) and donors (phenols) varies depending on the origin of HA, confirming that phenolic groups slow the oxidative transformation of quinones [61]. Furthermore, due to its polyanionic nature, HA can bind metal ions through various chemical and physical mechanisms [60]. This chelating ability allows HA to sequester pro-oxidant metal ions, which would otherwise catalyze the formation of ROS via Fenton reactions [60]. By binding these metals, these compounds reduce their availability for oxidative processes, thereby mitigating oxidative stress [62]. It is important to emphasize that the origin of HA may impart distinct functional characteristics [63,64], necessitating an investigation into the molecular mechanisms underlying the modulation of oxidative stress markers. In the present study, we did not evaluate these molecular mechanisms. This limitation should be overcome in future studies through RNA sequencing or proteomic analyses to investigate the underlying causes of this modulation.

Despite the well-documented beneficial effects of HA and their classification as safe compounds in the literature [55], we observed a decrease in SOD activity in the kidneys of Sham + HA animals compared to Sham animals. SOD is an antioxidant marker with the specific ability to scavenge intracellular and extracellular superoxide radicals *in vivo* by decomposing them into hydrogen peroxide and oxygen molecules [65]. Therefore, although H₂O₂ levels showed no significant differences between the Sham and Sham + HA

groups, and these markers improved in OVX animals treated with HA, it is crucial for future studies to explore the specific responses of renal tissue to treatment with these compounds.

Although most of the literature highlights the potential therapeutic effects of HA in human cell culture studies [58,66] and preclinical research [17,32,67], the oral administration of a commercial formulation of these compounds has already been investigated for its effects on the gut microbiota of healthy individuals, demonstrating potential in modulating the innate colonic microbiome [68]. Additionally, in a double-blind, placebo-controlled study, the administration of brown coal-derived potassium humate (a product with high levels of HA) showed potential as an anti-inflammatory agent in treating atopic conditions such as allergic rhinitis [69]. Furthermore, in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, the administration of Shilajit extract (a compound containing 60–80% humic substances) was found to attenuate increased bone turnover, inflammation, and oxidative stress in women with osteopenia [70]. However, to date, no clinical or preclinical studies have investigated the effects of isolated HA on osteopenia or osteoporosis, making our study the first to explore this relationship.

Despite the careful execution of the experiment and analyses, our study is not without limitations. In this study, we did not evaluate markers of bone remodeling such as RANKL (Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand) and OPG (osteoprotegerin), as well as components of the bone cellular matrix (osteoclasts, osteoblasts, and osteocytes) that are altered in osteoporosis. Another limitation of this study is that we did not conduct experiments to assess the molecular mechanisms involved in the modulation of oxidative stress markers. Therefore, future studies should consider evaluating these parameters to determine the influence of HA on these specific parameters. Additionally, the present study examined the effects of only 28 days of treatment. Given that the changes induced by ovariectomy are permanent and irreversible without treatment, it would be valuable for future studies to assess the effects of long-term HA administration. Despite the outlined limitations, the design and findings of this study are novel, original, and promising. Our results provide a strong foundation for future clinical research on the use of HA derived from biomass vermicomposting to prevent and treat conditions associated with estrogen decline during climacteric and menopause. Unlike conventional sources, this sustainable approach offers a potentially more bioavailable and environmentally friendly alternative, reducing reliance on chemically synthesized humic acid. Furthermore, our study pioneers the application of biomass-derived humic acid in a preclinical model of estrogen deficiency, addressing a critical gap in the current literature and presenting a viable strategy for both health and environmental sustainability.

5. Conclusions

Treatment with HA derived from agricultural biomass vermicompost improves the elemental composition of bone and modulates oxidative stress markers in the gastrocnemius muscle, liver, and kidneys of ovariectomized animals.

Author Contributions: Conceptualization, E.F.A., L.B.D., A.R.T.M. and L.J.P.; methodology, T.C.d.S., H.P.S., K.R.L., M.L.N.S., G.d.S.C., L.C.J.P.P., N.O.B., L.B.R., F.G.F., D.R.O., B.D.B.B., M.F.D.-P., A.R.T.M., L.B.D., L.J.P. and E.F.A.; formal analysis, G.d.S.C., F.G.F., D.R.O., A.R.T.M., L.B.D. and E.F.A.; resources, E.F.A., L.C.J.P.P., B.D.B.B. and A.R.T.M.; writing—original draft preparation, T.C.d.S., M.F.D.-P., L.B.D.,

A.R.T.M., D.R.O., L.J.P. and E.F.A.; writing—review and editing, A.R.T.M., D.R.O., L.J.P. and E.F.A.;

visualization, T.C.d.S., L.B.D., A.R.T.M., B.D.B.B., D.R.O., L.J.P. and E.F.A.; supervision, A.R.T.M., L.B.D., L.J.P. and E.F.A.; project administration, E.F.A.; funding acquisition, E.F.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by FAPEMIG—Foundation for Research Support of Minas Gerais State (Grant number: APQ-01100-24).

Institutional Review Board Statement: This study was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Lavras (CEUA/UFLA—protocol 3643011123).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors on request.

Acknowledgments: The authors would like to thank the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais—FAPEMIG), National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq), and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—CAPES).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Blümel, J.E.; Lavín, P.; Vallejo, M.S.; Sarrá, S. Menopause or Climacteric, Just a Semantic Discussion or Has It Clinical Implications? *Climacteric* **2014**, *17*, 235–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Davis, S.R.; Pinkerton, J.A.; Santoro, N.; Simoncini, T. Menopause—Biology, Consequences, Supportive Care, and Therapeutic Options. *Cell* **2023**, *186*, 4038–4058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Clynes, M.A.; Harvey, N.C.; Curtis, E.M.; Fuggle, N.R.; Dennison, E.M.; Cooper, C. The Epidemiology of Osteoporosis. *Br. Med. Bull.* **2020**, *133*, 105–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ishikawa, A.; Matsushita, H.; Shimizu, S.; Morita, N.; Hanai, R.; Sugiyama, S.; Watanabe, K.; Wakatsuki, A. Impact of Menopause and the Menstrual Cycle on Oxidative Stress in Japanese Women. *J. Clin. Med.* **2023**, *12*, 829. [[CrossRef](#)]
- Xiao, P.L.; Cui, A.Y.; Hsu, C.J.; Peng, R.; Jiang, N.; Xu, X.H.; Ma, Y.G.; Liu, D.; Lu, H.D. Global, Regional Prevalence, and Risk Factors of Osteoporosis According to the World Health Organization Diagnostic Criteria: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Osteoporos. Int.* **2022**, *33*, 2137–2153. [[CrossRef](#)]
- Anam, A.K.; Insogna, K. Update on Osteoporosis Screening and Management. *Med. Clin. N. Am.* **2021**, *105*, 1117–1134. [[CrossRef](#)]
- Zhu, Z.; Yu, P.; Wu, Y.; Wu, Y.; Tan, Z.; Ling, J.; Ma, J.; Zhang, J.; Zhu, W.; Liu, X. Sex Specific Global Burden of Osteoporosis in 204 Countries and Territories, from 1990 to 2030: An Age-Period-Cohort Modeling Study. *J. Nutr. Health Aging* **2023**, *27*, 767–774. [[CrossRef](#)]
- Kanis, J.A.; McCloskey, E.V.; Johansson, H.; Cooper, C.; Rizzoli, R.; Reginster, J.Y. European Guidance for the Diagnosis and Management of Osteoporosis in Postmenopausal Women. *Osteoporos. Int.* **2013**, *24*, 23–57. [[CrossRef](#)]
- Gosset, A.; Pouillès, J.M.; Trémollières, F. Menopausal Hormone Therapy for the Management of Osteoporosis. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2021**, *35*, 101551. [[CrossRef](#)]

10. Liang, J.; Shang, Y. Estrogen and Cancer. *Annu. Rev. Physiol.* **2013**, *75*, 225–240. [[CrossRef](#)]
11. Pan, M.; Zhou, J.; Pan, X.; Wang, J.; Qi, Q.; Wang, L. Drugs for the Treatment of Postmenopausal Symptoms: Hormonal and Non-Hormonal Therapy. *Life Sci.* **2023**, *312*, 121255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Huyut, Z.; Bakan, N.; Yildirim, S. Do Avanafil and Zaprinas Exert Positive Effects on Bone Tissue via the Nitric Oxide/Cyclic Guanosine Monophosphate/Protein Kinase-g Signaling Pathway in Rats with Ovariectomy-Induced Osteoporosis? *Braz. J. Pharm. Sci.* **2021**, *57*, e18976. [[CrossRef](#)]
13. Pop, A.L.; Nasui, B.A.; Bors, R.G.; Penes, O.N.; Prada, A.G.; Clotea, E.; Crisan, S.; Cobelschi, C.; Mehedintu, C.; Carstoiu, M.M.; et al. The Current Strategy in Hormonal and Non-Hormonal Therapies in Menopause—A Comprehensive Review. *Life* **2023**, *13*, 649. [[CrossRef](#)]
14. Marcucci, G.; Domazetovic, V.; Nediani, C.; Ruzzolini, J.; Favre, C.; Brandi, M.L. Oxidative Stress and Natural Antioxidants in Osteoporosis: Novel Preventive and Therapeutic Approaches. *Antioxidants* **2023**, *12*, 373. [[CrossRef](#)]
15. Mohamed, S.M.; Shalaby, M.A.; El-Shiekh, R.A.; El-Banna, H.A.; Emam, S.R.; Bakr, A.F. Metabolic Syndrome: Risk Factors, Diagnosis, Pathogenesis, and Management with Natural Approaches. *Food Chem. Adv.* **2023**, *3*, 100335. [[CrossRef](#)]
16. Zhang, C.-Y.; Liu, S.; Yang, M.; Bond, C.S.; Fellow, P. Antioxidant and Anti-Inflammatory Agents in Chronic Liver Diseases: Molecular Mechanisms and Therapy. *World J. Hepatol.* **2023**, *15*, 180–200. [[CrossRef](#)]
17. Lima, K.R.; Tavares, H.G.; Pereira, R.R.d.S.; Carvalho, J.d.C.L.; Botelho, R.d.O.; Spuri, A.C.R.; Dobbss, L.B.; Machado, A.R.T.; Orlando, D.R.; Remédio, R.N.; et al. Humic Acid Derived from Vermicompost Inhibits Alveolar Bone Degradation and Protects Against Renal Injury in an Experimental Model of Periodontitis. *Biomedicines* **2024**, *12*, 2710. [[CrossRef](#)]
18. Jung, H.; Kwon, S.; Kim, J.H.; Jeon, J.R. Which Traits of Humic Substances Are Investigated to Improve Their Agronomical Value? *Molecules* **2021**, *26*, 760. [[CrossRef](#)]
19. Sarlaki, E.; Sharif Paghaleh, A.; Kianmehr, M.H.; Asefpour Vakilian, K. Extraction and Purification of Humic Acids from Lignite Wastes Using Alkaline Treatment and Membrane Ultrafiltration. *J. Clean. Prod.* **2019**, *235*, 712–723. [[CrossRef](#)]
20. Canellas, L.P.; Olivares, F.L.; Okorokova-Façanha, A.L.; Façanha, A.R. Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 1951–1957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Tikhonov, V.V.; Byzov, B.A.; Zavgorodnyaya, Y.A.; Demin, V.V. Earthworms as Modifiers of the Structure and Biological Activity of Humic Acids. *Biol. Bull.* **2011**, *38*, 17–24. [[CrossRef](#)]
22. Mudroňová, D.; Karaffová, V.; Semjon, B.; Nad', P.; Koščová, J.; Bartkovský, M.; Makiš, A.; Bujňák, L.; Nagy, J.; Mojžišová, J.; et al. Effects of Dietary Supplementation of Humic Substances on Production Parameters, Immune Status and Gut Microbiota of Laying Hens. *Agriculture* **2021**, *11*, 744. [[CrossRef](#)]
23. Cagin, Y.F.; Sahin, N.; Polat, A.; Erdogan, M.A.; Atayan, Y.; Eyol, E.; Bilgic, Y.; Seckin, Y.; Colak, C. The Acute Effect of Humic Acid on Iron Accumulation in Rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **2016**, *171*, 145–155. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. García, A.C.; Santos, L.A.; de Souza, L.G.A.; Tavares, O.C.H.; Zonta, E.; Gomes, E.T.M.; García-Mina, J.M.; Berbara, R.L.L. Vermicompost Humic Acids Modulate the Accumulation and Metabolism of ROS in Rice Plants. *J. Plant Physiol.* **2016**, *192*, 56–63. [[CrossRef](#)]

25. Çalışır, M.; Akpınar, A.; Talmaç, A.C.; Lektemur Alpan, A.; Göze, Ö.F. Humic Acid Enhances Wound Healing in the Rat Palate. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2018**, *2018*, 1783513. [[CrossRef](#)]
26. Huang, J.; Xu, P.; Shao, M.; Wei, B.; Zhang, C.; Zhang, J. Humic Acids Alleviate Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis by Positively Modulating Gut Microbiota. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1147110. [[CrossRef](#)]
27. Çalışır, M.; Akpınar, A.; Poyraz, Ö.; Göze, F.; Çınar, Z. The Histopathological and Morphometric Investigation of the Effects of Systemically Administered Humic Acid on Alveolar Bone Loss in Ligature-Induced Periodontitis in Rats. *J. Periodontal Res.* **2016**, *51*, 499–507. [[CrossRef](#)]
28. Çalışır, M.; Akpınar, A.; Poyraz, Ö.; Göze, F.; Çınar, Z. Humic Acid, a Polyphenolic Substance, Decreases Alveolar Bone Loss in Experimental Periodontitis in Rats. *J. Vet. Dent.* **2019**, *36*, 257–265. [[CrossRef](#)]
29. Orlando, P.R.; Tavares, H.G.; Pereira, R.R.d.S.; Silva, G.; Carvalho, J.d.C.L.; Machado, A.R.T.; Dobbs, L.B.; Dias-Peixoto, M.F.; Pereira, L.J.; Andrade, E.F. Humic Acid Derived from Agricultural Biomass Mitigates Alveolar Bone Loss and Modulates Systemic Inflammatory Cytokines in Rats with Periodontitis. *Curr. Top. Med. Chem.* **2025**, *25*, 645–656. [[CrossRef](#)]
30. Wang, C.W.; McCauley, L.K. Osteoporosis and Periodontitis. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2016**, *14*, 284–291. [[CrossRef](#)]
31. Yu, B.; Wang, C.Y. Osteoporosis and Periodontal Diseases—An Update on Their Association and Mechanistic Links. *Periodontol. 2000* **2022**, *89*, 99–113. [[CrossRef](#)]
32. Tavares, H.G.; Orlando, P.R.; de Souza Pereira, R.R.; Magalhães, C.O.D.; Silva, G.; dos Santos Nunes Ferreira, A.; Garcia, B.C.C.; Lima, K.R.; Vieira, E.R.; Dobbss, L.B.; et al. Humic Acid from Vermicompost Effectively Regulates the Redox Status and Mitigates the Progression of Experimental Periodontitis. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **2025**, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sanchez, K.; Wu, S.L.; Kakkar, R.; Darling, J.S.; Harper, C.S.; Fonken, L.K. Ovariectomy in Mice Primes Hippocampal Microglia to Exacerbate Behavioral Sickness Responses. *Brain Behav. Immun. Health* **2023**, *30*, 100638. [[CrossRef](#)]
34. Pereira, R.R.d.S.; de Castro, G.B.; Magalhães, C.O.D.; Costa, K.B.; Garcia, B.C.C.; Silva, G.; Carvalho, J.d.C.L.; Machado, A.R.T.; Vieira, E.R.; Cassilhas, R.C.; et al. High-Intensity Interval Training Mitigates the Progression of Periodontitis and Improves Behavioural Aspects in Rats. *J. Clin. Periodontol.* **2024**, *51*, 1222–1235. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Okata, H.; Nakamura, M.; Henmi, A.; Yamaguchi, S.; Mikami, Y.; Shimauchi, H.; Sasano, Y. Calcification during Bone Healing in a Standardised Rat Calvarial Defect Assessed by Micro-CT and SEM-EDX. *Oral Dis.* **2015**, *21*, 74–82. [[CrossRef](#)]
36. Bradford, M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Banerjee, D.; Kumar, P.A.; Kumar, B.; Madhusoodanan, U.K.; Nayak, S.; Jacob, J. Determination of Absolute Hydrogen Peroxide Concentration by Spectrophotometric Method. *Curr. Sci.* **2002**, *83*, 1193–1194.
38. Dieterich, D.C.; Lee, J.J.; Link, A.J.; Graumann, J.; Tirrell, D.A.; Schuman, E.M. Labeling, Detection and Identification of Newly Synthesized Proteomes with Bioorthogonal Non-Canonical Amino-Acid Tagging. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 532–540. [[CrossRef](#)]
39. Aebi, H. Catalase In Vitro. *Methods Enzymol.* **1984**, *105*, 121–126. [[CrossRef](#)]

40. Omolaso, B.O.; Ogunmiluyi, O.E.; Adeniran, A.G.; Adesanwo, J.K.; Akinlaja, D.O. The Modulatory Influence of Humic Acid on Cognitive Impairment and Neurobehavioral Changes Induced by Colitis in Adult Male Wistar Rats. *Nutrire* **2024**, *49*, 46. [[CrossRef](#)]
41. Alkan Ozdemir, S.; Ozdemir, N.; Aksan, O.; Kınalı, B.; Bilici Güler, G.; Erbil, G.; Ozer, E.E.; Ozer, E.E. Effect of Humic Acid on Oxidative Stress and Neuroprotection in Hypoxic-Ischemic Brain Injury: Part 1. *J. Matern.-Fetal Neonatal Med.* **2022**, *35*, 4580–4589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Rodríguez-Landa, J.F. Considerations of Timing Post-Ovariectomy in Mice and Rats in Studying Anxiety- and Depression-Like Behaviors Associated with Surgical Menopause in Women. *Front. Behav. Neurosci.* **2022**, *16*, 829274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Mann, S.N.; Pitel, K.S.; Nelson-Holte, M.H.; Iwaniec, U.T.; Turner, R.T.; Sathiaselan, R.; Kirkland, J.L.; Schneider, A.; Morris, K.T.; Malayannan, S.; et al. 17α -Estradiol Prevents Ovariectomy-Mediated Obesity and Bone Loss. *Exp. Gerontol.* **2020**, *142*, 111113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Vigil, P.; Meléndez, J.; Petkovic, G.; Del Río, J.P. The Importance of Estradiol for Body Weight Regulation in Women. *Front. Endocrinol.* **2022**, *13*, 951186. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Hsieh, C.-C.; Hernández-Ledesma, B.; Kuryłowicz, A. Estrogens in Adipose Tissue Physiology and Obesity-Related Dysfunction. *Biomedicines* **2023**, *11*, 690. [[CrossRef](#)]
46. Burch, K.E.; McCracken, K.; Buck, D.J.; Davis, R.L.; Sloan, D.K.; Curtis, K.S. Relationship Between Circulating Metabolic Hormones and Their Central Receptors During Ovariectomy-Induced Weight Gain in Rats. *Front. Physiol.* **2022**, *12*, 800266. [[CrossRef](#)]
47. Cao, J.J.; Gregoire, B.R. Calcium Deficiency Decreases Bone Mass without Affecting Adiposity in Ovariectomized Rats Fed a High-Fat Diet. *Nutrients* **2024**, *16*, 478. [[CrossRef](#)]
48. Persky, A.M.; Green, P.S.; Stublely, L.; Howell, C.O.; Zaulyanov, L.; Brazeau, G.A.; Simpkins, J.W.; Greene, P.S.; Stublely, L.; Howell, C.O.; et al. Protective Effect of Estrogens Against Oxidative Damage to Heart and Skeletal Muscle In Vivo and In Vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **2000**, *223*, 59–66.
49. Šromová, V.; Sobola, D.; Kaspar, P. A Brief Review of Bone Cell Function and Importance. *Cells* **2023**, *12*, 2576. [[CrossRef](#)]
50. Cheng, C.H.; Chen, L.R.; Chen, K.H. Osteoporosis Due to Hormone Imbalance: An Overview of the Effects of Estrogen Deficiency and Glucocorticoid Overuse on Bone Turnover. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1376. [[CrossRef](#)]
51. Rybalka, M.A.; Stepchenko, L.M.; Shuleshko, O.O.; Zhorina, L.V. The Impact of Humic Acid Additives on Mineral Metabolism of Rabbits in the Postnatal Period of Ontogenesis. *Regul. Mech. Biosyst.* **2020**, *11*, 289–293. [[CrossRef](#)]
52. Tzaphlidou, M. Bone Architecture: Collagen Structure and Calcium/Phosphorus Maps. *J. Biol. Phys.* **2008**, *34*, 39–49. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kourkoumelis, N.; Balatsoukas, I.; Tzaphlidou, M. Ca/P Concentration Ratio at Different Sites of Normal and Osteoporotic Rabbit Bones Evaluated by Auger and Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy. *J. Biol. Phys.* **2012**, *38*, 279–291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Henmi, A.; Okata, H.; Anada, T.; Yoshinari, M.; Mikami, Y.; Suzuki, O.; Sasano, Y. Bone Matrix Calcification during Embryonic and Postembryonic Rat Calvarial Development Assessed by SEM-EDX Spectroscopy, XRD, and FTIR Spectroscopy. *J. Bone Miner. Metab.* **2016**, *34*, 41–50. [[CrossRef](#)]
55. Hriciková, S.; Kožárová, I.; Hudáková, N.; Reitznerová, A.; Nagy, J.; Marcincák, S. Humic Substances as a Versatile Intermediary. *Life* **2023**, *13*, 858. [[CrossRef](#)]

56. Sagredo, A.; del Campo, L.; Martorell, A.; Navarro, R.; Martín, M.C.; Blanco-Rivero, J.; Ferrer, M. Ovariectomy Increases the Participation of Hyperpolarizing Mechanisms in the Relaxation of Rat Aorta. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e73474. [[CrossRef](#)]
57. Bellanti, F.; Matteo, M.; Rollo, T.; De Rosario, F.; Greco, P.; Vendemiale, G.; Serviddio, G. Sex Hormones Modulate Circulating Antioxidant Enzymes: Impact of Estrogen Therapy. *Redox Biol.* **2013**, *1*, 340–346. [[CrossRef](#)]
58. Vašková, J.; Velická, B.; Pilátová, M.; Kron, I.; Vaško, L. Effects of Humic Acids In Vitro. *Vitr. Cell. Dev. Biol. Anim.* **2011**, *47*, 376–382. [[CrossRef](#)]
59. Zykova, M.V.; Schepetkin, I.A.; Belousov, M.V.; Krivoshechekov, S.V.; Logvinova, L.A.; Bratishko, K.A.; Yusubov, M.S.; Romanenko, S.V.; Quinn, M.T. Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Humic Acids Isolated from Peat of Various Origins. *Molecules* **2018**, *23*, 753. [[CrossRef](#)]
60. Vašková, J.; Stupák, M.; Vidová Ugurbas, M.; Žatko, D.; Vaško, L. Therapeutic Efficiency of Humic Acids in Intoxications. *Life* **2023**, *13*, 971. [[CrossRef](#)]
61. Aeschbacher, M.; Graf, C.; Schwarzenbach, R.P.; Sander, M. Antioxidant Properties of Humic Substances. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 4916–4925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Paciolla, M.D.; Kolla, S.; Jansen, S.A. The Reduction of Dissolved Iron Species by Humic Acid and Subsequent Production of Reactive Oxygen Species. *Adv. Environ. Res.* **2002**, *7*, 169–178. [[CrossRef](#)]
63. Vetvicka, V.; Baigorri, R.; Zamarreño, A.M.; Garcia-Mina, J.M.; Yvin, J.C. Glucan and Humic Acid: Synergistic Effects on the Immune System. *J. Med. Food* **2010**, *13*, 863–869. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Verrillo, M.; Cuomo, P.; Montone, A.M.I.; Savy, D.; Spaccini, R.; Capparelli, R.; Piccolo, A. Humic Substances from Composted Fennel Residues Control the Inflammation Induced by *Helicobacter Pylori* Infection in AGS Cells. *PLoS ONE* **2023**, *18*, e0281631. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Yu, X.; Xu, R.; Huang, W.; Lin, L.; Zheng, F.; Wu, X. Superoxide Dismutase as a Protective Factor for Microalbuminuria in Hypertensive Patients. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 20432. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Yen, C.C.; Lu, F.J.; Huang, C.F.; Chen, W.K.; Liu, S.H.; Lin-Shiau, S.Y. The Diabetogenic Effects of the Combination of Humic Acid and Arsenic: In Vitro and in Vivo Studies. *Toxicol. Lett.* **2007**, *172*, 91–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Ozkan, A.; Sen, H.M.; Sehitoglu, I.; Alacam, H.; Guven, M.; Aras, A.B.; Akman, T.; Silan, C.; Cosar, M.; Karaman, H.I.O. Neuroprotective Effect of Humic Acid on Focal Cerebral Ischemia Injury: An Experimental Study in Rats. *Inflammation* **2014**, *38*, 32–39. [[CrossRef](#)]
68. Swidsinski, A.; Dörffel, Y.; Loening-Baucke, V.; Gille, C.; Reißhauer, A.; Göktas, O.; Krüger, M.; Neuhaus, J.; Schrödl, W. Impact of Humic Acids on the Colonic Microbiome in Healthy Volunteers. *World J. Gastroenterol.* **2017**, *23*, 885–890. [[CrossRef](#)]
69. Gandy, J.J.; Meeding, J.P.; Snyman, J.R.; Jansen Van Rensburg, C.E. Clinical Efficacy of Potassium Humate in the Treatment of Allergic Rhinitis: Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Drug Dev. Res.* **2010**, *71*, 358–363. [[CrossRef](#)]
70. Pingali, U.; Nutalapati, C. Shilajit Extract Reduces Oxidative Stress, Inflammation, and Bone Loss to Dose-Dependently Preserve Bone Mineral Density in Postmenopausal Women with Osteopenia: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Phytomedicine* **2022**, *105*, 154334. [[CrossRef](#)].

TERCEIRA PARTE

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As evidências obtidas neste estudo confirmam que o AH derivado da vermicompostagem exerce efeitos benéficos sobre a composição óssea e o estresse oxidativo em um modelo experimental de depleção estrogênica induzida por ovariectomia. Esses achados ressaltam o potencial terapêutico deste composto não apenas na atenuação da perda óssea pós-ovariectomia, mas também em condições caracterizadas por comprometimento do remodelamento ósseo, como a osteoporose e outras doenças metabólicas ósseas. Além disso, os achados reforçam a necessidade de investigações adicionais, especialmente sobre os mecanismos de ação envolvidos, a fim de elucidar de forma mais abrangente seus efeitos biológicos e ampliar sua aplicabilidade como uma alternativa terapêutica promissora.

REFERÊNCIAS

- ABILDGAARD, J. *et al.* **Increased systemic inflammation and altered distribution of T-cell subsets in postmenopausal women.** PLoS ONE, v. 15, n. 6, 2020.
- ADHIKARY, S. **Vermicompost, the story of organic gold:** A review. Agricultural Sciences, v. 03, n. 07, p. 905–917, 2012.
- AGARWAL, A. *et al.* **The effects of oxidative stress on female reproduction:** A review. Reproductive Biology and Endocrinology. v. 10, n. 1, p. 49, 2012
- AL-QARALEH, S. Y. *et al.* **Evaluation of the antioxidant activities of green synthesized selenium nanoparticles and their conjugated polyethylene glycol (PEG) form in vivo.** OpenNano, v. 8, 2022.
- AMINI, L. *et al.* **The Effect of Combined Vitamin C and Vitamin e Supplementation on Oxidative Stress Markers in Women with Endometriosis:** A Randomized, Triple-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. Pain Research and Management, . v. 2021.
- ANAGNOSTIS, P. *et al.* **Estrogen and bones after menopause: a reappraisal of data and future perspectives.** Hormones, v. 20, p. 13, 2021
- ANTUNES, R. M. *et al.* **Transformações químicas dos ácidos húmicos durante o processo de vermicompostagem de resíduos orgânicos.** Engenharia Sanitaria e Ambiental, v. 20, n. 4, p. 699–708, 2015.
- ARIF, M. *et al.* **Humic acid as a feed additive in poultry diets:** A review. Iranian Journal of Veterinary Research, v. 20, n. 3, p. 167–172, 2019.
- BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. **Ácidos Húmicos.** Revista Ceres, v. 61, p. 856–881, 2014.
- BELLANTI, F. *et al.* **Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes:** Impact of estrogen therapy. Redox Biology, v. 1, n. 1, p. 340–346, 2013.
- BIRBEN, E. *et al.* **Oxidative Stress and Antioxidant Defense.** World allergy organization journal, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
- BOURGONJE, A. R. *et al.* **Systemic oxidative stress is increased in postmenopausal women and independently associates with homocysteine levels.** International Journal of Molecular Sciences, v. 21, n. 1, 2020.
- BOYCE, B. F.; XING, L. **Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 473, n. 2, p. 139-146, 2008.
- BRADY, C. W. **Liver disease in menopause.** World Journal of Gastroenterology, v. 21, n. 25, p. 7613–7620, 2015.
- BRUCE, D.; RYMER, J. **Symptoms of the menopause.** Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology, v. 23, n. 1, p. 25–32, 2009.

ÇALIŞIR, M. *et al.* **Humic Acid Enhances Wound Healing in the Rat Palate.** Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2018.

CHAUDHARY, P. *et al.* **Oxidative stress, free radicals and antioxidants: potential crosstalk in the pathophysiology of human diseases.** *Frontiers in chemistry*, v. 11, p. 1158198, 2023.

CHENG, C. H.; CHEN, L. R.; CHEN, K. H. **Osteoporosis Due to Hormone Imbalance: An Overview of the Effects of Estrogen Deficiency and Glucocorticoid Overuse on Bone Turnover.** *International journal of molecular sciences*, v. 23, n. 3, p. 1376, 2022.

CLYNES, M. A. *et al.* **The epidemiology of osteoporosis.** *British medical bulletin*, v133, n. 1, p. 105–117, 2020.

DAVAN, I. *et al.* **Astaxanthin as a Potent Antioxidant for Promoting Bone Health: An Up-to-Date Review.** *Antioxidants*, v. 12, n. 7, p. 1480, 2023.

DAVIS, S. R. *et al.* **Menopause—Biology, consequences, supportive care, and therapeutic options.** *Cell*, v 186, n. 19, p. 4038–4058, 2023.

DOSHI, S.; AGARWAL, A. **The role of oxidative stress in menopause.** *Journal of Mid-life Health*, v. 4, n. 3, p. 140, 2013.

DRUMMOND, A. E.; FINDLAY, J. K. **The role of estrogen in folliculogenesis.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 151, n. 1-2, p. 57-64, 1999

ENLI, Y.; ÖZTEKIN, Ö.; PINARBASILI, R. D. **The nitroxide tempol has similar antioxidant effects as physiological levels of 17 β -oestradiol in reversing ovariectomy-induced oxidative stress in mice liver and kidney.** *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 69, n. 4, p. 526–534, 2009.

FISCHER, V.; HAFFNER-LUNTZER, M. **Interaction between bone and immune cells: Implications for postmenopausal osteoporosis.** *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 123, n. April 2021, p. 14–21, 2022.

FLIEGER, J. *et al.* **Antioxidants: Classification, natural sources, activity/capacity measurements, and usefulness for the synthesis of nanoparticles.** *Materials*, v. 14, n. 15, p. 4135, 2021.

GIORDANO, H. *et al.* **Humic acid from vermicompost effectively regulates the redox status and mitigates the progression of experimental periodontitis.** *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2025.

GREENDALE, G. *et al.* **The menopause.** *The Lancet*, v. 353, n. 9152, p. 571-580, 1999

HADJIDAKIS, D. J.; ANDROULAKIS, I. I. **Bone remodeling.** *Annals of the New York academy of sciences*, v. 1092, n. 1, p. 385-396, 2006.

HADWAN, M. H. **Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in**

biological tissues. BMC Biochemistry, v. 19, n. 1, 2018.

HAJAM, Y. A. *et al.* **Oxidative Stress in Human Pathology and Aging: Molecular Mechanisms and Perspectives.** Cells, 1 fev. 2022. v. 11, n. 3, 2022.

HERAVI, A. S. *et al.* **Oxidative Stress and Menopausal Status: The Coronary Artery Risk Development in Young Adults Cohort Study.** Journal of Women's Health, v. 31, n. 7, p. 1057–1065, 2022.

HUANG, J. *et al.* **Humic acids alleviate dextran sulfate sodium-induced colitis by positively modulating gut microbiota.** Frontiers in Microbiology, v. 14, 2023.

HUYUT, Z.; BAKAN, N.; YILDIRIM, S. **Do avanafil and zaprinast exert positive effects on bone tissue via the nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate/protein kinase-g signaling pathway in rats with ovariectomy-induced osteoporosis?** Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 57, p. e18976, 2021.

IANTOMASI, T. *et al.* **Oxidative Stress and Inflammation in Osteoporosis: Molecular Mechanisms Involved and the Relationship with microRNAs.** International journal of molecular sciences, v. 24, n. 4, p. 3772, 2023.

IKEDA, K.; HORIE-INOUE, K.; INOUE, S. **Functions of estrogen and estrogen receptor signaling on skeletal muscle.** The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, v. 191, p. 105375, 2019.

INFANTE, M. *et al.* **RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling: Involvement in breast cancer and clinical perspectives.** Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, v. 38, n. 1, p. 12, 2019.

INNES, K. E.; SELFE, T. K.; TAYLOR, A. G. Menopause, the metabolic syndrome, and mind-body therapies. **Menopause**, v. 15, n. 5, p. 1005–1013, 2008.

IORGA, A. *et al.* **The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy.** Biology of sex differences, v. 8, n. 1, p. 33, 2017.

ISHIKAWA, A. *et al.* **Impact of Menopause and the Menstrual Cycle on Oxidative Stress in Japanese Women.** Journal of Clinical Medicine, v. 12, n. 3, 2023.

JAESCHKE, H.; RAMACHANDRAN, A. **Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver.** Journal of Hepatology, v. 55, n. 1, p. 227–228, 2011.

JEFFERIES, Heather *et al.* **Glutathione.** ANZ Journal of Surgery, v. 73, n. 7, p. 517-522, 2003.

JUNG, H. *et al.* **Which traits of humic substances are investigated to improve their agronomical value?** Molecules, v. 26, 2021.

KERMATH, B. A.; GORE, A. C. **Neuroendocrine Control of the Transition to Reproductive Senescence: Lessons Learned from the Female Rodent Model.** Neuroendocrinology, v. 96, n. 1, p. 1–12, 2012.

KO, S. H.; KIM, H. S. **Menopause-associated lipid metabolic disorders and foods beneficial for postmenopausal women.** *Nutrients*, v. 12, n. 1, p. 202, 2020.

KOEBELE, S. V.; BIMONTE-NELSON, H. A. **Modeling menopause:** The utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. *Maturitas*, v. 87, p. 5–17, 2016.

KOMORI, T. **Animal models for osteoporosis.** *European journal of pharmacology*, v. 759, p. 287-294, 2015.

KOONS, G. L.; DIBA, M.; MIKOS, A. G. **Materials design for bone-tissue engineering.** *Nature Reviews Materials*. *Nature Reviews Materials*, v. 5, n. 8, p. 584-603, 2020.

KOTHA, R. R. *et al.* **Oxidative Stress and Antioxidants:** A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. *Antioxidants*, v. 11, n. 12, p. 2388, 2022.

KOWALTOWSKI, A. J. *et al.* **Mitochondria and reactive oxygen species.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 47, n. 4, p. 333-343, 2009.

LIANG, J.; SHANG, Y. **Estrogen and cancer.** *Annual review of physiology*, v. 75, n. 1, p. 225-240, 2013.

LINDSAY, R. The menopause and osteoporosis. *Obstetrics and Gynecology*, v. 87, p. 16–19, 1996.

LUO, H. *et al.* **Chrysoeriol:** a natural RANKL inhibitor targeting osteoclastogenesis and ROS regulation for osteoporosis therapy. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2025.

MATÉS, José M.; PÉREZ-GÓMEZ, Cristina; DE CASTRO, Ignacio Núñez. **Antioxidant enzymes and human diseases.** *Clinical biochemistry*, v. 32, n. 8, p. 595-603, 1999.

MEDINA-CONTRERAS, J. *et al.* **Ovariectomized rodents as a menopausal metabolic syndrome model.** A minireview. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 475, n. 1–2, p. 261–276, 2020.

MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. **Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body.** *Advances in medical sciences*, v. 63, n. 1, p. 68-78, 2018.

MOHAMAD, N.-V.; IMA-NIRWANA, S.; CHIN, K.-Y. **Are Oxidative Stress and Inflammation Mediators of Bone Loss Due to Estrogen Deficiency? A Review of Current Evidence.** *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, v. 20, n. 9, p. 1478–1487, 2020.

MORIN, Suzanne N. *et al.* **Clinical practice guideline for management of osteoporosis and fracture prevention in Canada: 2023 update.** *Cmaj*, v. 195, 2023.

MONTOYA-ESTRADA, A. *et al.* **Parameters of oxidative stress in reproductive and postmenopausal mexican women.** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, n. 5, 2020.

MUDROŇOVÁ, D. *et al.* **Effects of dietary supplementation of humic substances on production parameters, immune status and gut microbiota of laying hens.** *Agriculture (Switzerland)*, v. 11, n. 8, 2021.

OPOKU, A. A. . A. M. K. J. C. **Obesity and menopause.** *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 88, p. 102348, 2023.

OTTINGER, J. W. M. Z. D. I. M. **Ovarian Aging and Menopause: Current Theories, Hypotheses, and Research Models,** p. 818–828, 2005.

PATEL, S. *et al.* **Estrogen: The necessary evil for human health, and ways to tame it.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 102, p. 403-411, 2018.

PEI, J. *et al.* **Research progress of glutathione peroxidase family (GPX) in redoxitation.** *Frontiers in pharmacology*, v. 14, p. 1147414, 2023.

PU, D. *et al.* **Metabolic syndrome in menopause and associated factors: a meta-analysis.** *Climacteric*, v. 20, n. 6, p. 583–591, 2017.

PUTTI, J. *et al.* **Effects of lipoic acid and w-3 long-chain polyunsaturated fatty acids on the kidney in the ovariectomized rat model of menopause.** *Nutrition*, 2019

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. **Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016.

RUSLIANDI; ROUSDY, D. W.; MUKARLINA. **The Anti-Inflammatory Activity of Humic Acid from Borneo Peat Soil in Mice.** *Majalah Obat Tradisional*, v. 25, n. 1, p. 22–28, 2020.

SAAR, Robert A.; WEBER, James H. **Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry.** *Environmental science & technology*, v. 16, n. 9, p. 510A-517A, 1982.

SALEHI, M. *et al.* **Activation of apoptosis and G0/G1 cell cycle arrest along with inhibition of melanogenesis by humic acid and fulvic acid: BAX/BCL-2 and Tyr genes expression and evaluation of nanomechanical properties in A375 human melanoma cell line.** *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, v. 25, n. 4, p. 489, 2022.

SARLAKI, E. *et al.* **Extraction and purification of humic acids from lignite wastes using alkaline treatment and membrane ultrafiltration.** *Journal of Cleaner Production*, v. 235, p. 712–723, 2019.

SENA, Larissa Morais *et al.* **Composting and vermicomposting as an alternative for treatment and disposal of organic waste.** 2019.

SILVA DIAS, D. DA *et al.* **Exercise training initiated at old stage of lifespan attenuates aging- and ovariectomy-induced cardiac and renal oxidative stress: Role of baroreflex.** *Experimental Gerontology*, v. 124, n. May, p. 110635, 2019.

SOCOL, D. C. **Clinical review of humic acid as an antiviral: Leadup to translational**

- applications in clinical humeomics.** *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, p. 1018904, 2023.
- SONG, S. *et al.* **Advances in pathogenesis and therapeutic strategies for osteoporosis.** *Pharmacology and Therapeutics*, v. 237, p. 108168, 2022.
- SONG, S. *et al.* **Advances in pathogenesis and therapeutic strategies for osteoporosis.** *Pharmacology & therapeutics*, v. 237, p. 108168, 2022.
- SOUZA, V. R. *et al.* **Description of ovariectomy protocol in mice.** In: *Pre-clinical models: Techniques and protocols*. New York, NY: Springer New York, 2018. p. 303-309.
- STOIA, M.; OANCEA, S. **Low-Molecular-Weight Synthetic Antioxidants: Classification, Pharmacological Profile, Effectiveness and Trends.** *Antioxidants*, v. 11, n. 4, p. 638, 2022.
- SUTTON, R.; SPOSITO, G. **Molecular structure in soil humic substances: the new view.** *Environmental science & technology*, v. 39, n. 23, p. 9009-9015, 2005.
- THAKUR, ANJANA *et al.* **A review on vermicomposting: By-products and its importance.** *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, v. 22, n. 11-12, p. 156-164, 2021.
- TOBEIHA, M. *et al.* **RANKL/RANK/OPG Pathway: A Mechanism Involved in Exercise-Induced Bone Remodeling.** *BioMed research international*, v. 2020, n. 1, p. 6910312, 2020.
- TROFIMOVA, E. S. *et al.* **Influence of humic acids extracted from peat by different methods on functional activity of macrophages in Vitro.** *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v. 162, n. 6, p. 741–745, 2017.
- TURRENS, J. F. **Mitochondrial formation of reactive oxygen species.** *The Journal of physiology*, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.
- VAŠKOVÁ, J. *et al.* **Effects of humic acids in vitro.** *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, v. 47, n. 5–6, p. 376–382, 2011.
- VENEZIA, V. *et al.* **A study on structural evolution of hybrid humic Acids-SiO₂ nanostructures in pure water: Effects on physico-chemical and functional properties.** *Chemosphere*, v. 287, n. P1, p. 131985, 2022.
- WANG, M. **Osteoporosis and Periodontitis.** *Current osteoporosis reports*, v. 14, n. 6, p. 284-291, 2016.
- WINKLER, John; GHOSH, Sanjoy. **Therapeutic potential of fulvic acid in chronic inflammatory diseases and diabetes.** *Journal of diabetes research*, v. 2018, n. 1, p. 5391014, 2018.
- XIAO, P. L. *et al.* **Global, regional prevalence, and risk factors of osteoporosis according to the World Health Organization diagnostic criteria: a systematic review and meta-analysis.** *Osteoporosis International*, v. 33, n. 10, p. 2137–2153, 2022.
- XU, P. *et al.* **Humic acids alleviate aflatoxin B1-induced hepatic injury by reprogramming gut microbiota and absorbing toxin.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 259, 2023..

YANG, J. *et al.* **Progress in Understanding Oxidative Stress, Aging, and Aging-Related Diseases.** *Antioxidants*, v. 13, n. 4, p. 394, 2024.

YONG, EU-LEONG; LOGAN, S. **Menopausal osteoporosis screening, prevention.** *Singapore Medical Journal*, v. 62, n. 4, p. 159, 2021.

ZACARÍAS-FLORES, M. *et al.* **Relationship between oxidative stress and muscle mass loss in early postmenopause:** an exploratory study. *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*, v. 65, n. 6, p. 328–334, 2018.

ZHU, Z. *et al.* **Sex Specific Global Burden of Osteoporosis in 204 Countries and Territories, from 1990 to 2030:** An Age-Period-Cohort Modeling Study. *Journal of Nutrition, Health and Aging*, v. 27, n. 9, p. 767–774, 2023.