

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FITOESTROGÊNICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO E DA INFUSÃO DAS FOLHAS DE *Morus nigra* L.**

Ana Paula Nunes Bitencourt Vanoni

Porto Alegre
Novembro de 2006

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FITOESTROGÊNICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO E DA INFUSÃO DAS FOLHAS DE *Morus nigra* L.**

Ana Paula Nunes Bitencourt Vanoni

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Augusto Langeloh.

Co-orientadora: Dra. Eliane Dallegrove.

**Porto Alegre
Novembro de 2006**

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que trabalham pelo desenvolvimento da educação baseada no amor e compreensão, buscando o sentido primordial de nossa existência.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Augusto Langeloh, pela destreza em transmitir seus ensinamentos referentes à pesquisa científica, sempre fundamentados na compreensão, amizade e incentivo.

À Dra. Eliane Dallegrave, pela generosidade e amor pela educação, princípios estes essenciais para o suporte técnico e colaboração para o crescimento profissional e espiritual de seus alunos.

Aos bolsistas de iniciação científica que participaram deste trabalho, colaborando para a execução dos experimentos, bem como à Dra. Ângela Lopes.

Aos professores, funcionários, mestrandos, doutorandos, bolsistas e estagiários do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, pela acolhida e amizade.

Aos meus colegas do Colégio Luterano da Paz, pela crença na educação de jovens para a pesquisa avançada, especialmente, Marilda, Márcia, Carmen, Ana Silvia, Paulo e Edílcia, exemplos de dedicação e fé.

À minha família, alicerce da construção de meus ideais, e à quem dedico todo o meu esforço, hoje e sempre, especialmente Eduardo e Matheus, por iluminarem meus caminhos.

Ao meu marido Marco, por ter sido o melhor companheiro, mesmo nos momentos mais solitários da elaboração deste trabalho.

Aos animais, modelos experimentais, aos quais dediquei o meu mais profundo respeito.

EPÍGRAFE

“ Todo projeto de vida que não for feito com amor, compreensão e razão,
não deve então ser seguido”

Albert Einstein

RESUMO

Avaliou-se a influência do extrato hidroalcoólico e da infusão das folhas de *Morus nigra* L. em diferentes ensaios biológicos (uterotrófico em ratas adultas ovariectomizadas e em pré-púberes, e pubertal) em ratas Wistar. O objetivo dos ensaios foi avaliar a atividade estrogênica de *Morus nigra* observando-se o desenvolvimento uterino de ratas adultas ovariectomizadas e pré-púberes, e, a manifestação da abertura do canal vaginal, regularidade do ciclo estral e desenvolvimento uterino de ratas do desmame à puberdade. Os protocolos realizados foram embasados nos padrões estabelecidos pela *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) – Programa para a validação de ensaios uterotróficos como rastreamento de possíveis substâncias com atividades estrogênicas *in vitro*. O material vegetal foi coletado a campo, na cidade de Porto Alegre, RS e utilizado ainda fresco para a preparação da infusão e do extrato hidroalcoólico sendo o primeiro preparado por maceração mecânica das folhas (20g de folhas frescas) em 200ml de água destilada, e o segundo por maceração de 100g de folhas em 1000ml de solução hidroalcoólica (1:1), com posterior concentração em rotavapor à vácuo, ambos conservados sob refrigeração durante o período dos ensaios biológicos. O cálculo do resíduo seco para estas amostras foi efetuado com base na evaporação em estufa de volumes conhecidos em frascos de Becker, resultando em (média \pm desvio padrão) $5,4 \pm 0,32$ mg/ml de 7 amostras para a infusão e $123,1 \pm 0,17$ mg/ml de 9 amostras para o extrato hidroalcoólico. As ratas foram tratadas diariamente, por via oral com sonda flexível ou rígida, com 0,4mg/kg de benzoato de estradiol (controle positivo), 10ml/kg de óleo de canola (controle), 615,3mg/kg de extrato hidroalcoólico 50% ou 27,0mg/kg de infusão das folhas de *Morus nigra* L.. Os ensaios uterotróficos tiveram uma duração de 7 dias, para fêmeas ovariectomizadas e de 3 dias, para as pré-púberes, e o ensaio pubertal (subcrônico) cerca de 35 dias. Os resultados revelaram, no ensaio com ratas adultas ovariectomizadas, um aumento da massa corporal relativa dos grupos tratados com óleo de canola (controle) e extrato das folhas de *Morus nigra* L. em relação aos demais grupos (estradiol- controle positivo- e infusão das folhas de *Morus nigra* L.), bem como o aumento da massa relativa do útero úmido e seco dos grupos tratados com estradiol e

infusão de *Morus nigra*, acompanhado de retorno ao ciclo estral somente no grupo estradiol; em relação aos demais órgãos, houve redução significativa da massa de fígado e rins do grupo infusão de *Morus nigra* em relação aos demais grupos. No ensaio uterotrófico em ratas pré-púberes, os resultados demonstraram um aumento da massa corporal dos animais tratados com infusão de *Morus nigra* e um aumento na massa relativa do útero úmido e seco do grupo estradiol em relação aos demais. Nas fêmeas tratadas subcronicamente no ensaio pubertal, o grupo estradiol apresentou uma antecipação da abertura do canal vaginal, uma redução significativa da massa dos ovários e um aumento igualmente significativo na massa relativa do fígado em relação aos demais grupos e um aumento igualmente significativo na massa relativa do rim direito em comparação ao grupo controle. Conclui-se que o extrato hidroalcoólico e a infusão das folhas de *Morus nigra* não apresentaram atividade estrogênica (nas doses administradas) nos protocolos avaliados.

ABSTRACT

The influence of Morus nigra leaves was studied by using biological assays of uterotrophic models in Wistar rats. The present study was undertaken in order to evaluate a oestrogenic activity of Morus nigra extract or infusion through: the uterine development of ovariectomized rats treated with extract or infusion of Morus nigra leaves; the manifestation of secondary sexual characteristics such as timing of vaginal opening and uterine development of immature rats treated with extract or infusion of Morus nigra leaves and the manifestation of secondary sexual characteristics: estral cycle and uterine development in rats treated with extract or infusion of Morus nigra leaves, since the weaning until puberty. The biological assays showed in this work were based on OECD studies (Organization for Economic Co-operation and Development - Program to validate the uterotrophic bioassay to screen compounds for in vitro estrogenic responses). Field collected plants (Morus nigra fresh leaves) were used for the infusion and hydroalcoholic extract by mechanical maceration in water or hydroalcoholic solution (1:1), respectively. Both samples were conserved in refrigerator. Residuous material was dried (at room temperature) and evaporated in glasses, in order to evaluate their initial and final weight resulting in $5,4 \pm 0,32\text{mg/ml}$ of 7 samples of infusion and $123,1 \pm 0,17\text{mg/ml}$ of 9 samples of hydroalcoholic extract. The animals were treated with oestradiol (0,4mg/kg), canola oil (10ml/kg), hydroalcoholic extract 50% (615,3mg/kg) and infusion (27mg/kg) of Morus nigra fresh leaves by oral gavage. The rats were treated for 7,3 and approximately 35 days, respectively, in each experiment. It has been observed in ovariectomized rats that the body weight was reduced at the oestradiol and infusion groups, comparing to the others (canola oil, Morus nigra extract). Furthermore, results showed a significant increase of the body weight for the groups treated with canola oil and Morus nigra extract; results also showed a significant increase in the uterine weight for the groups treated with infusion and oestradiol, and an important return of the cycle phase for the animals treated with oestradiol, at the other organs, it has been observed a significant decrease of liver and kidneys weight for the group treated with Morus nigra infusion, comparing to the others. Both experiments with immature rats were compared: results showed a body weight gain of the rats treated with infusion of Morus nigra leaves, nevertheless, the oestradiol group had anticipation of vaginal opening, and an important increase of the uterine weight. The subchronical bioassay with immature rats showed an anticipation of vaginal opening, and also, a decrease in ovarian weight and an increase of the right kidney and liver weight. The main conclusion highlights that hydroalcoholic extract and infusion of Morus nigra leaves did not show an oestrogenic activity for the protocols and doses considered.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Aspecto da *Morus nigra* L. em período de frutificação: amoras em distintos graus de crescimento e maturação..... 26
- FIGURA 2** - Manipulação da fêmea para coleta do lavado vaginal e marcação da cauda para a identificação dos animais experimentais 30
- FIGURA 3** - Microfotografia do lavado vaginal de ratas demonstrando as fases do ciclo estral: proestro (a,b), estro (c,d), metaestro (e,f) e diestro (g,h). Leucócitos (L), células do epitélio (E) e células ceratinizadas (C) estão caracterizadas nas ilustrações. Ampliação de 10 X (na coluna da esquerda) ou 40 X (na coluna da direita), sem coloração..... 31
- FIGURA 4** - Desenvolvimento ponderal em percentual (massa corporal em gramas do 1º dia = 100%) das ratas ovariectomizadas durante o período de tratamento. Os marcadores representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=7)..... 39
- FIGURA 5** - Massa relativa (%) do útero úmido e seco das fêmeas adultas ovariectomizadas tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão das folhas de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=7)..... 40

- FIGURA 6 -** Massa relativa do fígado (%) das fêmeas tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão das folhas de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=7)..... 41
- FIGURA 7 -** Massa relativa (%) dos rins de ratas adultas ovariectomizadas referentes aos grupos experimentais tratados com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=7)..... 42
- FIGURA 8 -** Massa relativa (%) das adrenais de ratas adultas ovariectomizadas referentes aos grupos experimentais tratados com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=7)..... 43
- FIGURA 9 -** Desenvolvimento ponderal de ratas pré-púberes durante o período experimental dos grupos tratados com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *M. nigra*. Os marcadores representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=8)..... 44
- FIGURA 10 -** Massa relativa uterina (%) das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *M. nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=8)..... 45
- FIGURA 11 -** Massa relativa do fígado das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=8)..... 46

- FIGURA 12** - Massa relativa dos rins das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=8)..... 47
- FIGURA 13** - Massa relativa das adrenais das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=8)..... 48
- FIGURA 14** - Desenvolvimento ponderal em percentual (massa corporal em gramas do 1º dia = 100%) das ratas pré-púberes durante o período de tratamento. Os marcadores representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=10)..... 49
- FIGURA 15** - Massa relativa do útero úmido e útero seco das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=10)..... 50
- FIGURA 16** - Massa relativa do ovário direito e ovário esquerdo das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=10)..... 51
- FIGURA 17** - Massa relativa do fígado das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=10)..... 52

- FIGURA 18** - Massa relativa dos rins das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=10)..... 53
- FIGURA 19** - Massa relativa das adrenais das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=10)..... 54
- FIGURA 20** - Idade média na abertura do canal vaginal (dias) das ratas tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *Morus nigra*. As colunas representam a idade média (dias) e as barras os erros padrões (n=10)..... 55
- FIGURA 21** - Regularidade do ciclo estral (%) das ratas tratadas com óleo de canola (controle), estradiol, infusão e extrato de *Morus nigra*. As colunas representam o percentual de fêmeas com o ciclo regular (n=10)..... 56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABEAS** - Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior
- ANOVA** - Análise de variância
- ANVISA** - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- °C** - graus Celsius
- COBEA** - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
- cm** - centímetro (s)
- CREAL** - Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
- epm** - erro padrão da média
- g** - grama(s)
- h** - hora(s)
- ICBS** - Instituto de Ciências Básicas da Saúde
- kg** - quilograma (s)
- l** - litro(s)
- mg** - miligrama(s)
- ml** - mililitro (s)
- MR** - medidas repetidas
- N** - número de indivíduos da população
- n** - número de indivíduos presentes na amostra
- NOD** - *Non obese diabetic mice* (Camundongos diabéticos não obesos)
- OECD** - *Organization for Economic Co-operation and Development* (Organização para cooperação econômica e desenvolvimento)
- P** - nível de significância alcançado
- PUCRS** - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
- SERMS** - *Selective estrogens receptor modulators* (Modulador seletivo de receptor de estrogênio)
- UFRGS** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- WHI** - *Women's Health Initiative* (Iniciativa da saúde da mulher)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Fitoterapia e formas farmacêuticas.....	17
2.2	Terapia de reposição hormonal e fitoestrógenos.....	19
2.3	Fitoestrógenos da isoflavona: fitoquímica e mecanismo de ação.....	22
2.4	Utilização das plantas da família Moraceae.....	24
2.5	<i>Morus nigra</i> Linnaeus.....	26
2.6	Avaliação da atividade estrogênica.....	28
3	OBJETIVO.....	32
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1	Material vegetal.....	33
4.1.1	Coleta das folhas de <i>Morus nigra</i>	33
4.1.2	Preparo do extrato hidroalcoólico.....	33
4.1.3	Preparo da infusão.....	34
4.2	Resíduo seco.....	34
4.3	Animais Experimentais.....	34
4.3.1	Ensaio uterotrófico em ratas adultas ovariectomizadas.....	35
4.3.2	Ensaio uterotrófico em ratas pré-púberes.....	36
4.3.3	Ensaio pubertal em ratas.....	36
4.4	Análise estatística.....	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	Ensaio uterotrófico em ratas adultas ovariectomizadas.....	39
5.2	Ensaio uterotrófico em ratas pré-púberes.....	44
5.3	Ensaio pubertal em ratas.....	49
6	DISCUSSÃO.....	57
7	CONCLUSÃO.....	63
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

A terapia de reposição hormonal em medicina humana utiliza medicamentos alopáticos para repor hormônios que deixaram de ser produzidos pelo ovário em consequência da menopausa. No entanto, a segurança deste tipo de tratamento para mulheres ficou abalada após a publicação parcial e interrupção do estudo americano multicêntrico, randomizado, duplo-cego, controlado com placebo, realizado por pesquisadores do *Women's Health Initiative* (WHI). Este estudo demonstrou que os riscos globais excediam os benefícios: houve um aumento significativo do risco de doença arterial coronariana, de acidente vascular cerebral, de tromboembolismo venoso; um decréscimo significativo do risco de câncer de cólon e do risco total de fraturas e, quanto ao câncer de mama, apresentou uma relação de risco em razão do tempo de duração da tratamento (VIGETA, 2004).

Segundo Koo Han (2002), a utilização de fitoestrogênios poderia ser justificada por possuírem alguns dos efeitos do estrogênio, porém, não seriam carcinogênicos. Muitos estudos têm assinalado efeitos benéficos dos fitoestrógenos na prevenção de várias doenças crônicas como os cânceres de cólon, mama e próstata, e doenças cardiovasculares. Nas pacientes na pós-menopausa, observou-se que os fitoestrógenos são capazes de reduzir os sintomas e que estes, poderiam prevenir algumas doenças crônicas que ocorrem no climatério, como a osteoporose (AGNUSDEI & BUFALINO, 1997). As propriedades estrogênicas e antiestrogênicas dos fitoestrógenos decorrem da sua interação com receptores de estrogênio (KONDO *et al*, 1990), visto que os chamados lignanos e as isoflavonas têm atividade estrogênica fraca e, às vezes, antiestrogênica (como o tamoxifeno). Sob o aspecto químico, estes fitormônios são compostos não-esteróides que uma parte das plantas fabrica em células não especializadas e que apresentam, quase sempre, um anel fenólico em sua estrutura e são capazes de aderir, em sua maioria, aos receptores estrogênicos (ou proestrogênicos) humanos. São classificados, então, em moduladores de receptores estrogênicos (SERMS – *selective estrogen receptor modulators*) agindo como agonistas ou antagonistas do estrogênio, a depender do tipo de receptores onde atuam. Os fitormônios são absorvidos pelo trato gastrointestinal após desconjugação pela flora, resultando em fenóis

heterocíclicos com estrutura semelhante ao estrogênio humano, conferindo-lhes biodisponibilidade (FRANCO, 2005).

A amoreira negra (*Morus nigra* L.) e a amoreira branca (*Morus alba*) são árvores asiáticas da família *Moraceae*, que possuem alguns fitoesteróides. Estes, estão sendo usados (mais comumente o da amoreira branca) com sucesso como a terapia de reposição hormonal natural, embora sejam conhecidos mundialmente por suas ações como adstringente e adjuvante para o tratamento das afecções bucais, corrimentos vaginais e ulcerações da pele (FRANCO, 2005). Acredita-se que o chá das folhas de amoreira negra, objetivo deste estudo, podem auxiliar na produção de estrona (hormônio da terceira idade) que tem 40% da ação do estradiol. Hormônio este, ligado às características sexuais secundárias da mulher, que deixa de ser produzido pelo ovário no climatério (COSMO ON LINE, 2004). Sabe-se que os fitoestrógenos são substâncias naturais produzidas por algumas plantas e que apresentam estrutura química diferente dos estrógenos, mas que atuam de modo similar. Pesquisadores analisaram os fatores distintivos das populações asiáticas (povos em cuja prática da utilização de plantas medicinais é um forte aspecto cultural) dos povos ocidentais, visto que os primeiros possuem baixas taxas de câncer de mama e próstata. Descobriram que a dieta asiática inclui alto nível de fitoestrógenos (sobretudo proveniente da soja e derivados) o que poderia influenciar na menor prevalência de doenças e na facilidade com que as mulheres asiáticas convivem com a menopausa (NAHÁS *et al.*, 2003). Outras publicações sugerem que, na medicina tradicional indiana, certas plantas são utilizadas no tratamento dos sintomas indesejáveis da menopausa. Na forma de preparações herbais, estes fitoterápicos administrados experimentalmente em ratas pré- púberes e em ratas ovariectomizadas, são responsáveis por um aumento significativo da massa uterina dos animais em ambos ensaios, o que confere sua atividade uterotrófica associada à existência de flavonóides na preparação herbal possuindo, portanto, alta atividade estrogênica (GOPUMADHAVAN *et al.*, 2005). No entanto, a utilização e aceitação de produtos fitoterápicos é bastante polêmica, devido, principalmente, ao número restrito de estudos no sentido da garantia de ação biológica (eficácia), bem como da segurança quanto à isenção de efeitos tóxicos ou indesejáveis dos produtos utilizados pela população (SONAGLIO, 1987).

Estudos farmacológicos de amoreiras (incluindo a *M. nigra* L.), publicados até o presente momento, não referem uma possível atividade fitoestrogênica. Os relatos da medicina popular e citações na literatura não científica (Folha de São Paulo, 2001)

sugerem que o chá das folhas de *Morus nigra* L. podem apresentar tal atividade. A investigação científica de plantas usadas pela população para fins medicinais é interessante a medida que muitas informações populares podem ser verificadas para garantir-se a qualidade e inocuidade de tais produtos fitoterápicos. A atribuição popular leva a crer que a utilização das folhas de *M. nigra* L. possa amenizar os efeitos da menopausa nas mulheres que fazem uso da infusão diariamente. Este fato, impulsiona a curiosidade em testar tais efeitos no tocante à terapia de reposição hormonal. A eventual comparação do efeito hormonal avaliado em modelo experimental, pode contribuir com a possibilidade de um tratamento adicional aos já existentes, possivelmente com menos efeitos adversos e mais acessível à população em geral. Os mecanismos responsáveis pelos efeitos dos fitoestrógenos não são claramente compreendidos, porém existem evidências sugestivas de que os mesmos possam agir de acordo com dois mecanismos receptores de estrógeno: dependente e independente (GINSBURG *et al*, 2000). Muitos estudos têm demonstrado que os fitoestrógenos ligados aos receptores de estrogênio mostram efeitos significativos em animais, em humanos e em cultura de células (ADLERCREUTZ *et al*, 1992).

Frente ao exposto, no presente trabalho foi avaliada a possível atividade fitoestrogênica do extrato hidroalcoólico e da infusão das folhas de *Morus nigra* L. sobre o útero de ratas pré púberes e adultas ovariectomizadas, bem como a possível antecipação da puberdade de ratas pré púberes.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Fitoterapia e formas farmacêuticas

A utilização de plantas medicinais e/ou seus derivados como agentes terapêuticos naturais tem por objetivo prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças, com um custo mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde, comparativamente àqueles obtidos por síntese química, que são, em geral, mais caros devido às patentes tecnológicas envolvidas (TOLEDO *et al*, 2003).

Os produtos naturais utilizados para fins medicinais, contudo, devem visar a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e sua segurança de utilização, além de valorizar o seu potencial terapêutico. Para garantir estes objetivos, a produção de fitoterápicos requer estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos, para a obtenção de metodologias analíticas e tecnológicas plausíveis (MIGUEL & MIGUEL, 1999).

A pesquisa efetiva em fitoterapia inicia-se pelo levantamento em literatura científica e catálogos internacionais nas áreas específicas do referido conhecimento, e possui caráter interdisciplinar, multidisciplinar e interinstitucional, uma vez que abrange diversas áreas do conhecimento, como a botânica, a química, ecologia, farmacologia, toxicologia, entre outras. O conhecimento da etnobotânica, o qual trata da observação do uso popular de plantas nas diferentes culturas, também se faz relevante na coleta de informações para o estudo da fitoterapia (CAMARGO, 1998).

A administração de fármacos, tanto em medicina humana quanto em medicina veterinária, requer a incorporação em uma forma farmacêutica caracterizada normalmente pelo estado físico de apresentação, constituída de componentes farmacologicamente ativos e de adjuvantes farmacêuticos. Algumas formas farmacêuticas de relevância para o presente estudo serão mencionadas: quanto as formulações líquidas utilizadas experimentalmente na atualidade, destacam-se as resinas, óleos e, principalmente, o sumo das partes frescas do vegetal, os quais são utilizados para uma ampla variedade de preparações fitoterápicas aquosas obtidas por diversos métodos (TOLEDO *et al*, 2003). As chamadas alcoolaturas são preparados que utilizam

plantas frescas (excepcionalmente plantas secas) por maceração em temperatura ambiente com etanol. Os alcoolatos são obtidos por destilação da matéria-prima fresca em etanol. Certos estudos que avaliam a atividade estrogênica para o tratamento dos sintomas da menopausa relatam a utilização destes preparados alcoolatos de diversas espécies botânicas (potencialmente fitoestrogênicas), sugerindo sua utilização na suplementação da dieta de mulheres afetadas pela sintomatologia do climatério (LIU *et al.*, 2001). Os extratos podem apresentar-se líquidos, moles, espessos ou secos. Destaca-se a importância de extratos aquosos serem preparados para o uso imediato, em virtude de sua suscetibilidade à degradação e à contaminação microbiana inerente à presença de água como solvente (TOLEDO *et al.*, 2003). O mesmo cuidado é sugerido para as preparações herbais em forma de infusão, preconizando-se, ainda, a refrigeração das amostras por um curto período de tempo para retardar o desenvolvimento de microorganismos. Conforme normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2004) entende-se por infusão o método de preparação no qual a água, em temperatura acima de 90°C, é vertida sobre o produto que deve permanecer em repouso, diferente do chá, que é o produto constituído de uma ou mais partes de espécies vegetais fragmentadas ou moídas, com ou sem fermentação. A mesma resolução da ANVISA define os métodos de decocção (método de preparação no qual o produto é fervido em água) e esgotamento (processo tecnológico utilizado para retirar parcial ou totalmente a(s) substância(s) sávida(s) ou aromática(s) de uma espécie vegetal). Já as cápsulas, as quais representam 60% das formulações comercializadas nas farmácias de manipulação, são uma das formas farmacêuticas de maior aceitação em medicina humana. Segundo Miguel & Miguel. (2002), estas formas são destinadas à administração oral, vaginal ou retal. Estudos em medicina veterinária incentivam a utilização de *pellets* contendo preparações herbais provenientes das folhas de *Mangifera indica* L e *Morus nigra* L. como forrageira para coelhos de criação, por possuírem um grande valor nutritivo, importante para o bom funcionamento do aparato digestório destes animais (DEMETEROVÁ, 1998).

2.2. Terapia de reposição hormonal e fitoestrógenos

O déficit estrogênico decorrente do fim da função reprodutiva do ovário facilita a apresentação de sintomas indesejáveis nas mulheres acometidas pela menopausa. Entre alguns dos efeitos mais brandos, pode-se citar aqueles responsáveis pela denominação muito utilizada em medicina humana para a caracterização da fase: síndrome do climatério, cuja principal característica é a ruborização da face e o “abafamento” ou “calorão”. Outros efeitos são descritos, tais como: distúrbios psíquicos, atrofia do aparato genitourinário, osteoporose e enfermidades cardiovasculares, este último, constitui a principal causa de morte em mulheres pós-menopáusicas que vivem nos países desenvolvidos (DESPAIGNE, 2001).

A terapia de reposição hormonal é capaz de reverter quase todas as conseqüências do hipoestrogenismo pós-menopáusicas, porém apenas 35% a 40% das mulheres o utilizam, e muitas que iniciam o tratamento não dão continuidade. Um dos principais motivos da relutância em iniciar a terapia de reposição hormonal é a percepção da prescrição médica de estrógenos como um método “não-natural”, por isso, estudos atuais procuram investigar a ação de fitoestrógenos, fitoterápicos nos quais se detecta hormônio estrogênico (GLAZIER *et al*; 2001).

Nos anos 70, a terapia de reposição hormonal foi severamente condenada pelo sugerido aumento de riscos de câncer de mama e endométrio em mulheres expostas, portanto, o tratamento deve ser empregado preferencialmente por curto prazo e sua indicação limita-se ao controle dos sintomas climatéricos, mesmo assim quando o benefício (alívio dos sintomas vasomotores e melhoria do trofismo e lubrificação da mucosa vaginal) suplantar o risco (WANNMACHER & LUBIANCA, 2004). A terapia de reposição hormonal era vista como um método de redução dos riscos de infarto do miocárdio em mulheres na pós-menopausa, mas, evidências recentes parecem contradizer os estudos observacionais (MORELLI *et al*; 2002).

Os estrógenos provenientes de plantas foram detectados no ano de 1926 por Dohrn *et al.*, e em 1930 simultaneamente por Butenandt and Jacobi e Skarzynsky. Tais resultados, no entanto, não obtiveram um método efetivo de detecção do hormônio e, para a época, apenas tiveram um caráter de pioneirismo nas pesquisas em fitoterapia (JANECZKO e SKOCZOWSKI, 2005). Estudos mais elaborados foram realizados para

a detecção de hormônios esteróides em plantas (128 espécies de 50 famílias) com técnicas de radioimunofluorescência em 1989 (SIMONS e GRINWICH, 1989). Por meio dos avanços tecnológicos na área da farmacologia, atualmente sabe-se que os fitoestrogênios com maior ação estrogênica são as isoflavonas presentes no gérmen de soja, estes se apresentam quimicamente como compostos não-esteróides, que se ligam fracamente aos receptores estrogênicos (menos de 1% da afinidade de ligação do estradiol). Os referidos compostos apresentam ação seletiva, isto é, exibem atividade estrogênica em alguns tecidos e antiestrogênica em outros (BAKER *et al.*, 2000). Há evidências de que a isoflavona diminui a intensidade e frequência dos sintomas vasomotores em mulheres na menopausa (HAN *et al.*, 2002). A maioria dessas observações sobre o uso dos fitoestrogênios são epidemiológicas, muitas delas baseadas em estudos realizados em regiões de alto consumo de soja (LISSIN & COOKE, 2000). Alguns autores sugerem diferentes terapias que poderiam substituir a reposição hormonal clássica, evitando desta forma o risco de câncer de mama que a terapia de reposição hormonal pode causar. Uma destas terapias sugere a utilização dos chamados moduladores seletivos do receptor estrogênico (SERMs), podendo ser naturais (como os mencionados fitoestrógenos) ou sintéticos (COMINO, 1999), como os derivados do trifeniletileno (tamoxifeno, idoxifeno, droloxifeno, toremifeno e clomifeno), entre outros compostos.

Um levantamento da literatura científica inglesa citado por Glazier *et al.* (2001), identificou mais de 1000 artigos publicados nos últimos 30 anos sobre fitoestrógenos. No total, 74 foram selecionados para a inclusão em um artigo de revisão baseados na relevância dos assuntos. Os estudos escolhidos incluíam pesquisas com fitoestrógenos na inibição do crescimento de células cancerígenas em linhagens celulares *in vitro* e em animais, o papel dos fitoestrógenos na redução dos níveis de colesterol e a utilização de um derivado (ipriflavona) na prevenção da osteoporose.

Na medicina veterinária, a reposição estrogênica também se constitui em um importante objeto de pesquisa para a preservação do perfil lipoprotéico em cadelas ovariectomizadas (SCHMIDT *et al.*, 2004), apresentando resultados compatíveis com aqueles citados na literatura humana, em que mulheres, após a menopausa, apresentam elevação nos níveis de colesterol total. É comprovado cientificamente que, após o início da reposição estrogênica, os valores tendem a diminuir, permanecendo dentro da normalidade (WOLFE & HUFF, 1995; SPEROFF *et al.*, 1996; SULLIVAN, 1996; GIANINI, 2001). Dalsenter (1991), abordando outro aspecto, refere a importância de se

estudar plantas produtoras de substâncias com atividade sobre o sistema reprodutor e que possam ser responsabilizadas pela redução da performance reprodutiva dos rebanhos bovinos e ovinos. Para Hughes (1996) a exposição a dieta fitoestrogênica, principalmente através de leguminosas, pode conduzir a inúmeros distúrbios reprodutivos. A composição química destes fitoestrógenos inclui flavonóides: isoflavonas como a genisteína e a daidzeína, e os cumestanos, como o cumesterol. O mecanismo de ação destes não está completamente estabelecido. Os efeitos dos fitoestrógenos são mais variados com relação à espécie animal e principalmente, quanto as fases da vida; durante a idade reprodutiva, reduzem a fertilidade de bovinos e ovinos, são agentes antifertilizantes com possíveis sítios de ação nos ovários, hipófise e no sistema nervoso central feminino (DALLEGRAVE, 1999).

No entanto, poucos estudos realizados examinaram a importância dos fitoestrógenos na prevenção dos sintomas da menopausa na espécie humana. Por este motivo, as evidências do uso destes fitoterápicos na substituição da terapia de reposição hormonal tradicional são insuficientes para uma recomendação na medicina humana e necessitam de um maior aprofundamento científico.

2.3 Fitoestrógenos da isoflavona: fitoquímica e mecanismo de ação

Uma das principais classes de fitoestrógenos são as isoflavonas encontradas nas sementes de leguminosas e em grande quantidade nos derivados de soja (THAN *et al*, 1998). A partir de estudos fitoquímicos realizados com os gêneros alimentícios mencionados, pôde-se identificar dois tipos de compostos que poderiam exercer efeitos benéficos em mulheres pós-menopáusicas, reduzindo a sintomatologia do climatério e, até mesmo, protegendo o organismo contra certas doenças, como a osteoporose, o câncer, e as doenças cardiovasculares: a genisteína e a daidzeína (YIN *et al*, 2000). As ações em nível celular e molecular destes compostos fitoestrogênicos podem ser influenciadas por muitos fatores, dentre os quais pode-se citar as condições do receptor e do tipo de órgão-alvo, bem como, o nível de estrogênios endógenos. Desta forma, quando há um nível elevado de estrogênios, as isoflavonas podem agir como antagonistas estrogênicos, em contrapartida, em níveis mais baixos (como nas mulheres pós-menopáusicas), as isoflavonas comportariam-se como agonistas estrogênicos (SETCHELL, 1998).

Considerada como o tipo de isoflavona mais estudada na atualidade, a genisteína tem sido citada em estudos científicos como um potente agente profilático e terapêutico para o tratamento do câncer e de outras doenças crônicas, além de apresentar resultados promissores no tratamento da menopausa em medicina humana (POLKOVSKI & MAZUREK, 2000). Quanto ao mecanismo de ação, tanto a genisteína quanto a daidzeína ligam-se aos receptores estrogênicos para gerar respostas estrogênicas, porém, estes compostos apresentam uma afinidade menor do que aquela apresentada pelo estradiol (POTTER *et al*, 1998). De forma interessante, a afinidade específica aos receptores α e β (onde sabe-se que as isoflavonas agem como potentes agonistas em receptores β e fracos agonistas em receptores α), poderia explicar as ações específicas dos fitoestrogênios, considerando-se ainda, também como fator preponderante, a distribuição desses receptores nos tecidos e órgãos-alvo (VINCENT & FITZPATRICK, 2000).

Comparados à terapia de reposição hormonal clássica, os fitoestrógenos revelam ser menos eficazes na redução de sintomas da menopausa, enquanto que, na prevenção de doenças cardiovasculares e aterosclerose, os compostos que conferem ação estrogênica às isoflavonas têm demonstrado ser tão eficientes quanto os estrogênios exógenos, ou até mesmo superiores em alguns casos (CLARKSON *et al*, 2001).

2.4 Utilização das plantas da família *Moraceae*

As plantas pertencentes ao gênero *Morus* (*Moraceae*) apresentam muitas propriedades medicinais relatadas na literatura científica. Utilizadas em larga escala na medicina popular chinesa, as partes aéreas e radiculares da planta possuem compostos bioativos de atividade antiinflamatória, diurética e expectorante. Estudos recentes mostraram que estas plantas apresentariam atividades antiespasmódicas e hipotensoras relacionadas à presença de compostos previamente isolados, do tipo *diels-alder*, como o *kuwanon G. chalconoracin e kuwanon E*, segundo Santos *et al.* (1996).

As folhas da amoreira (*Moraceae*), ricas em proteínas, fibras, minerais e vitamina C, também apresentam um tipo de glicoproteína chamada moran A a qual se atribui um efeito antidiabético (ANDALU *et al.*, 2001). No tocante ao efeito anti-hiperglicêmico, outros estudos referem a atividade da *Morus nigra L.* em preparações herbais com outras plantas, indicando uma diminuição significativa dos níveis de glicose e frutamina em ratos obesos não-diabéticos (NOD) induzidos pelo aloxano e tratados com os extratos (PETLEVSKY *et al.*, 2001).

Os frutos da amoreira negra são conhecidos não apenas por suas qualidades nutricionais e sabor característico, mas também pela sua utilização como fitoterápico. Alguns estudos já relataram que o diabetes melito do tipo II pode ser controlado através da ingestão de uma mistura caseira dos frutos com água, na forma de xarope ou suco. Além disso, o fruto também é utilizado popularmente para o tratamento das inflamações da garganta, língua e boca (MARTIN *et al.*, 2003).

Os efeitos dos compostos provenientes do córtex das raízes das plantas da família *Moraceae* foram elucidados através de experimentos realizados e as aplicações clínicas encontradas na literatura ou medicina chinesa. Estudos preliminares com diferentes modelos experimentais (ratos, camundongos, porquinho-da-Índia e cães) confirmaram as atividades catárticas, analgésicas, diuréticas, antitussígenas, antiedematosas, sedativas, anticonvulsivantes e hipotensivas relatadas na medicina chinesa. Tais efeitos resultam do tratamento dos animais com as frações hidrossolúvel e n-butanol adicionados às partes radiculares do vegetal. Outros efeitos dos extratos das folhas de espécimes da família *Moraceae* (*M. alba*) foram verificados através de ensaios crônicos: em coelhos tratados por administração parenteral e subcutânea, foi

diagnosticado degranulação das células beta das ilhotas de Langerhans em variados graus, quando o pâncreas dos animais experimentais foram analisados através de microscopia eletrônica (GULUBOVA e BOIADZHIOV, 1975).

Um composto chamado morusina, do grupo dos prenilflavonóides, foi isolado a partir das raízes de *Morus nigra* L. Quando administrados aos modelos experimentais clássicos de dor (camundongos), os compostos apresentaram ação analgésica, demonstrando uma potência similar àquela dos fármacos geralmente usados como referência para o tratamento antinociceptivo (SOUZA *et al.*, 2000). A ação antioxidante de extratos dos frutos de *Morus nigra* L. foi verificada obtendo-se como resultado a inibição da glicosilação da hemoglobina induzida pela glicose em diferentes graus. A hemólise de eritrócitos humanos induzida por peróxido de hidrogênio também foi inibida, comprovando a utilização farmacológica de diferentes partes vegetais de exemplares da família *Moraceae*. Tais resultados sugerem que os frutos de *M. nigra* L. apresentam uma ação protetora contra os danos oxidativos às membranas e biomoléculas (NADERI *et al.*, 2004). A atividade antioxidante não fica restrita aos frutos: as folhas de *M. nigra* L. também já foram investigadas sugerindo-se uma modificação sazonal dos compostos com tal atividade, onde verificou-se que os picos de substâncias antioxidantes ocorreriam no mês de outubro, caindo no mês de fevereiro, no hemisfério norte.

A literatura não-científica, refere que as folhas de *Morus nigra* apresentam estrona, entre outros compostos. Este composto pode conferir atividade estrogênica relativa a preparações fitoterápicas de suas folhas (COSMO ON LINE 2004; EMBRAFARMA, 2006).

2.5. *Morus nigra* Linnaeus

Morus nigra L. (Figura 1), conhecida popularmente como amoreira-negra, pertence a família *Moraceae*, e é composta de cerca de 61 gêneros com mais de 1000 espécies e se encontra bem representada no Brasil tanto por espécies indígenas como por cultivadas. É freqüente de um modo geral nas regiões tropicais de todo o mundo. Destacam-se dentre os gêneros com representantes exclusivamente cultivados a *Morus*, cujas folhas servem de alimento à lagarta do bicho da seda (*Bombix mori*) e cujas infrutescências, as amoras, são comestíveis e utilizadas na confecção de geléias (JOLY, 1985).



FIGURA 1 – Aspecto da *Morus nigra* L. em período de frutificação: amoras em distintos graus de crescimento e maturação.

Dentre as espécies lenhosas distribuídas nos países de climas quentes, a maior parte corresponde ao gênero *Ficus*, gênero ao qual pertencem as figueiras. *Morus nigra*, por sua vez, é uma espécie nativa da China, e apresenta-se como árvore ornamental, principalmente pelo efeito outonal de sua folhagem em regiões de clima ameno como

no sul e sudeste do Brasil. É empregada no paisagismo e na arborização urbana (JOLY, 1985).

Quanto à sua descrição morfofisiológica, a árvore é caducifolia e apresenta uma altura que varia entre 7 e 12 metros, com tronco revestido por uma casca fina, quase lisa, de cor acinzentada. É provida de ramos mais ou menos horizontais com as extremidades pendentes, formando uma copa achatada, morfologicamente. As folhas são simples, cartáceas, obovadas, variáveis e profundamente lobadas em amostras jovens e de margens serradas em plantas adultas, com nervação saliente e superfície superior brilhante, que varia entre 6 e 12cm de comprimento, com pecíolo de 1 a 2cm. Sua inflorescência é formada entre os meses de julho e agosto, com flores pequenas, quase sempre de um só sexo, agrupadas em inflorescências. Cada flor está constituída de 4 a 6 folhas pequenas. Os frutos são diminutos e secos ou carnosos com apenas uma semente, porém o receptáculo que o contém apresenta aspecto carnoso e suculento quando maduro assim como outras partes florais. Apresentam-se, portanto, como drupas compostas de formato cilíndrico e de superfície tuberculada, inicialmente vermelhos e pretos quando maduros, de 1 a 2cm de comprimento, de polpa carnosa e agridoce. As moráceas produzem o látex, suco leitoso que apresenta ceras ou resinas, produzindo, por vezes, alcalóides e glucosídeos, assim como certas essências (LORENZI *et al.*, 2003). Quanto à sua composição, quando maduros os frutos (amoras) contém cerca de 9% de açúcares (glicose e frutose), ácido málico (em estado livre 1,86%), materiais albuminóides e pectinas, gomas e materiais colorantes, com 85% de água. Na casca do tronco e nas raízes encontra-se malato cálcico. Quanto ao uso popular das partes vegetais, sabe-se que o xarope dos frutos se utiliza nas inflamações da garganta e da boca. A cortiça da raiz apresenta-se como purgante nas preparações por cozimento da mesma em água, sendo administradas no desjejum. Historicamente, certas bibliografias apontam as amoreiras como uma árvore conhecida mundialmente pela propriedade de relaxamento da musculatura uterina através da ingestão de seus frutos. Suas folhas apresentam-se eficientes no combate às dores de dente quando utilizadas em bochechos em forma de suco. (QUER,1980)

2.6 Avaliação da atividade estrogênica

Jun Kanno, *et al* (2001), referem a padronização dos protocolos de ensaios para detecção de atividade estrogênica ou anti-estrogênica conforme estabelecido pela OECD (Organization for Economic Co-operation and Development). Este órgão tem como objetivo produzir um conjunto de normas e estratégias reconhecidas internacionalmente para o rastreamento de compostos com atividade estrogênica, entre outras, realizados em animais experimentais e/ou *in vitro*. Estes incluem os ensaios uterotróficos e pubertal. Na chamada Fase 1 de planejamento, são realizados ensaios *in vivo* de curta duração, onde os protocolos tem por objetivo avaliar em ratas adultas ovariectomizadas e pré-púberes a relação dose-efeito entre a massa uterina e o estrógeno de referência (estradiol), comparativamente com as substâncias testadas, utilizando a via oral ou subcutânea. Na seqüência, são realizados ensaios *in vivo* de maior duração, como o pubertal, de forma a rastrear a possibilidade de efeitos estrogênicos decorrentes da ação de doses repetidas por períodos mais prolongados de estrógeno referência em comparação com as substâncias em teste.

O primeiro protocolo, utiliza ratas pré-púberes (21 dias de vida) com administração por via oral durante 3 dias, seguido de eutanasia, 24 horas após a última administração; o segundo protocolo, utiliza ratas adultas ovariectomizadas tratadas por 7 dias com eutanasia 24 horas após a última administração. Em ambos a variável utilizada como marcadora de atividade estrogênica é a massa relativa do útero úmido e seco. Reconhecido como referência segura, o estudo da OECD teve como líder o laboratório do Instituto Nacional de Ciências da Saúde do Japão (*National Institute of Health Sciences of Japan*), e os protocolos descritos anteriormente foram previamente testados por 9 laboratórios de 3 países, previamente a padronização. Todos os protocolos referidos pela OECD foram fundamentados em amostras de 6 animais por grupo, e o volume oral administrado não excedeu a 5ml/kg. Segundo os protocolos padronizados, a massa corporal dos animais deve ser mensurada diariamente. A massa corporal inicial das ratas pré-púberes utilizadas para os ensaios da OECD variou entre 26 e 57g entre os diversos laboratórios e para as adultas ovariectomizadas, 142 a 327g.

Foram alvos de interesse a massa uterina úmida e seca, visto que o aumento da massa uterina é a resposta fundamental da fêmea submetida à exposição suficiente à um agonista estrogênico (estradiol – controle positivo). A resposta inicial com a interação essencial do estrógeno com um receptor de alta afinidade no tecido uterino inicia uma série de eventos culminando com o aumento da massa uterina, este aumento é uma associação de embebição de água no tecido e lúmen uterinos com uma resposta hipertrófica destes tecidos. Portanto, acredita-se que os agonistas estrogênicos podem ser identificados por um aumento estatisticamente significativo da massa uterina nos animais tratados em comparação com os controles.

Historicamente, a maioria dos resultados uterotróficos publicados descreveram massas uterinas após a cuidadosa secagem do útero depois que sua parede fora perfurada ou cortada para permitir a drenagem do conteúdo luminal. A justificativa para mensurar a massa uterina seca (técnica também incorporada ao protocolo OECD) é, usualmente, que as massas úmidas são mais variáveis e a variabilidade aumenta com a possível perda de líquido do lúmen durante a dissecação e manipulação do tecido.

De acordo com os protocolos da OECD, tomaram-se precauções para especificar a idade dos animais incluídos nos experimentos de forma que o tratamento pode iniciar entre os 19-21 dias de idade (pré-púberes), limitando desta forma a massa corporal, evitando a inclusão inadvertida de animais mais velhos ao estudo, pois os mesmos poderiam alcançar a puberdade levando a um aumento na massa uterina controle, aumentando a variabilidade dos resultados (JUN KANO *et al*, 2001). Um ponto igualmente importante para o estudo da atividade estrogênica através do ensaio pubertal é a determinação das fases do ciclo estral das ratas, pois sabe-se que, em razão da curta duração de seu ciclo, estas espécies constituem um bom modelo para o estudo das alterações que ocorrem durante o ciclo reprodutivo (MARCONDES *et al*, 2001). O ciclo estral de ratas tem duração média de 4 ou 5 dias e é caracterizado por 4 fases, as quais podem ser determinadas pelos tipos celulares observados a fresco no lavado vaginal (CHAHOUUD & KWASIGROCH, 1977):

- a) Proestro (12h) – com grande número de células nucleadas e algumas células proliferativas do epitélio vaginal;
- b) Estro (14h) – com células cornificadas e anucleadas; a ovulação ocorre espontaneamente na metade do ciclo escuro durante esta fase;
- c) Metaestro (21h) – com inúmeros leucócitos e filamentos de muco;

d) Diestro (57h) – período de repouso onde a mucosa vaginal é fina, com poucas células nucleadas, leucócitos e muco.

Consideradas fêmeas poliéstricas anuais, as ratas manifestam vários ciclos estrais, de quatro a cinco dias, ao longo do ano (COBEA, 1996).

A Figura 2 mostra a forma correta de manipulação das ratas para o exame de esfregaço vaginal e a marcação na cauda para a diferenciação entre os animais utilizados experimentalmente. A Figura 3 ilustra as fases do ciclo estral detectadas por meio do exame a fresco do lavado vaginal em microscópio óptico com aumento de 100 vezes.

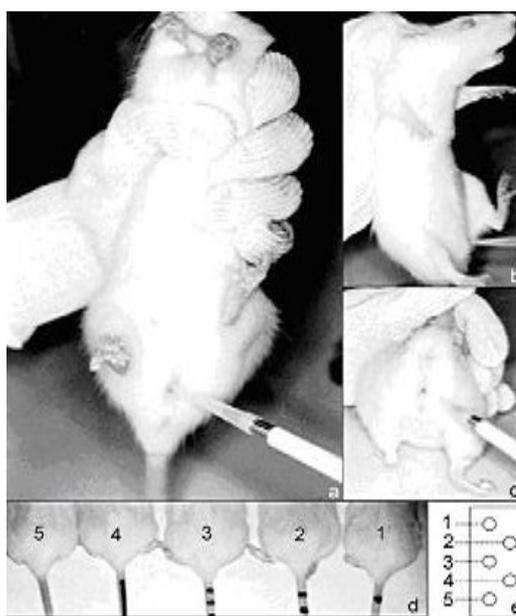


FIGURA 2 - Manipulação da fêmea para coleta do lavado vaginal e marcação da cauda para a identificação dos animais experimentais (MARCONDES, 2002).

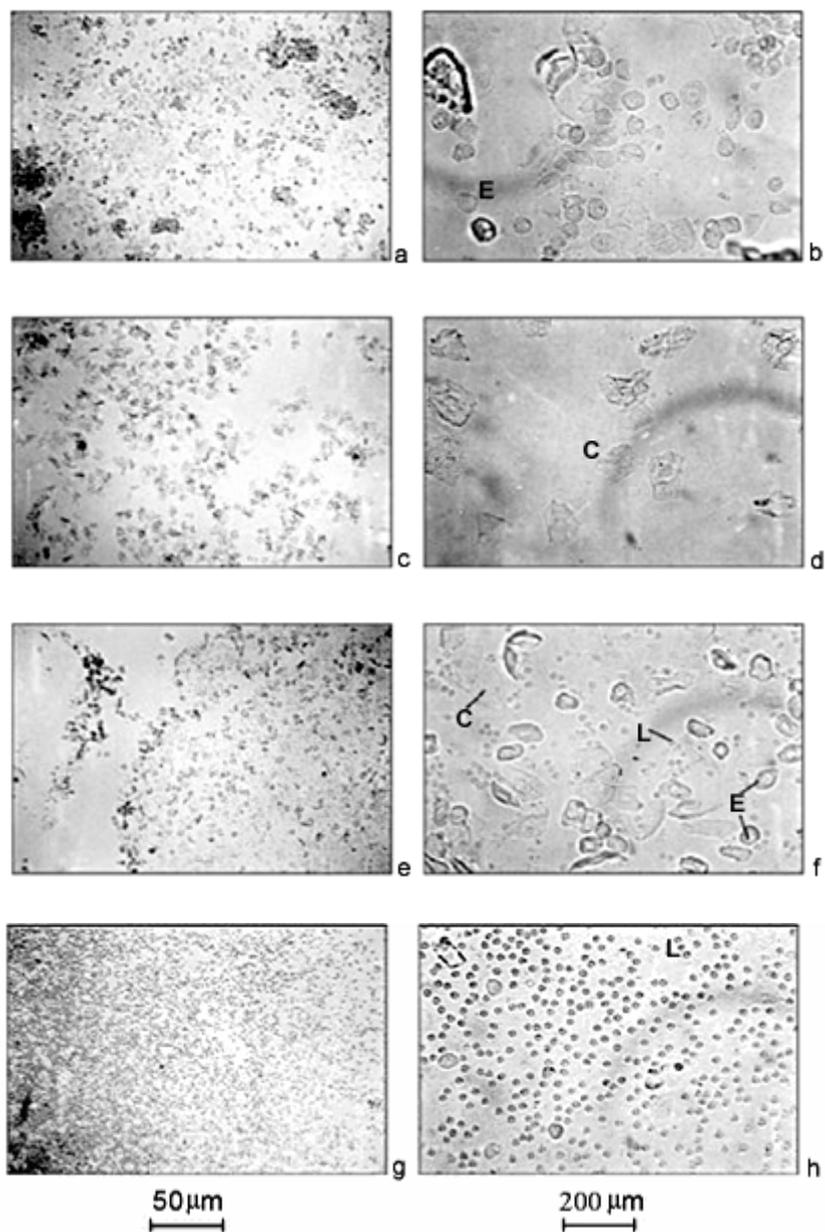


FIGURA 3- Microfotografia do lavado vaginal de ratas demonstrando as fases do ciclo estral: proestro (a,b), estro (c,d), metaestro (e,f) e diestro (g,h). Leucócitos (L), células do epitélio (E) e células ceratinizadas (C) estão caracterizadas nas ilustrações. Ampliação de 10 X (na coluna da esquerda) ou 40 X (na coluna da direita), sem coloração. (MARCONDES, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade fitoestrogênica do extrato hidroalcoólico e da infusão das folhas de *Morus nigra* L. em ratas Wistar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desenvolvimento uterino de ratas Wistar adultas ovariectomizadas tratadas com extrato hidroalcoólico ou infusão das folhas de *Morus nigra* L.
- Avaliar a manifestação das características sexuais secundárias: abertura do canal vaginal e desenvolvimento uterino de ratas Wistar pré-púberes tratadas com extrato hidroalcoólico ou infusão das folhas de *Morus nigra* L.
- Avaliar a manifestação das características sexuais secundárias: abertura do canal vaginal, ciclo estral e desenvolvimento uterino de ratas Wistar tratadas com extrato hidroalcoólico ou infusão das folhas de *Morus nigra* L. do desmame à puberdade.

4.MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

4.1.1 Coleta das folhas de *Morus nigra*

Foram utilizadas folhas de *Morus nigra* (herborizadas no Departamento de Botânica da UFRGS – excicata nº 144411) coletadas em junho de 2005 em Porto Alegre, RS. O material coletado foi utilizado ainda fresco para a preparação da infusão e do extrato hidroalcoólico.

4.1.2 Preparo do extrato hidroalcoólico

Foi obtido o extrato hidroalcoólico (1:1) por maceração de 100g de folhas em 1000ml de solução. O sobrenadante foi colhido durante 48 a 72 horas, período durante o qual o material resultante sofria agitações ocasionais. O processo de maceração e filtração do sobrenadante foi repetido por 3 vezes até que o filtrado de tornasse límpido. O extrato foi então concentrado à temperatura inferior à 50°C em rotavapor até o volume final de 100ml. O extrato foi conservado sob refrigeração, desde o preparo até o término do período de realização dos ensaios biológicos.

4.1.3 Preparo da infusão

A infusão foi obtida por maceração mecânica de 20g de folhas frescas em 200ml de água destilada a 90°C. A infusão foi preparada semanalmente, e conservada sob refrigeração durante os dias de tratamento dos animais.

4.2 Resíduo seco

O cálculo para a determinação do resíduo seco das soluções extrativas e da infusão foi efetuado com base na evaporação em estufa, de volumes conhecidos em frascos previamente tarados. Um mililitro de cada uma das amostras foi transferido para cada um dos três copos de Becker (5ml), com massa (g) previamente determinada. Estes foram levados à estufa (temperatura média de 100°C) até que a parte líquida da solução extrativa (infusão) e do extrato hidroalcoólico tivesse evaporado totalmente. Foram calculadas as médias das três medidas resultantes da diferença entre a massa inicial e final de cada um dos copos de Becker (referentes a cada uma das amostras), resultando em (média \pm desvio padrão de “N” repetições) $5,4 \pm 0,32$ mg/ml de 7 amostras para a infusão e $123,1 \pm 0,17$ mg/ml de 9 amostras para o extrato hidroalcoólico.

4.3 Animais experimentais

Foram utilizadas ratas fêmeas da linhagem Wistar (N=100), obtidas do CREAL (Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório) e mantidas no biotério do Departamento de Farmacologia do ICBS/UFRGS, em condições constantes de umidade e temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de claro e escuro de 12 horas, recebendo

ração comercial Nuvilab CR1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* durante os ensaios biológicos.

4.3.1 Ensaio uterotrófico em ratas adultas ovariectomizadas

Foram ovariectomizadas ratas de 60 dias (N=28). O procedimento foi realizado mediante anestesia dissociativa com a associação de tiletamina e zolazepam (Zoletil®) na dose de 20mg/kg, por via intramuscular. Na região dorsal, bilateralmente, foram retirados por arrancamento os pêlos e posteriormente, foi procedida a anti-sepsia com álcool iodado. Foram efetuadas duas incisões para-vertebrais (látero-dorsais) de aproximadamente 1cm de extensão, pelas quais exteriorizou-se os cornos uterinos e os ovários, as veias e artérias ovarianas foram ligadas com categute 4-0 com posterior remoção dos ovários. Por fim, suturou-se a parede muscular com categute 4-0 e a pele com mononylon 4-0. Ao final da cirurgia foi administrada benzilpenicilina benzatina 40.000UI/kg, por via intramuscular. O período de recuperação cirúrgica foi de 10 dias. Após este período, foram constituídos aleatoriamente quatro grupos experimentais (n=7/grupo). As ratas foram tratadas, diariamente, por via oral, com sonda flexível, por um período de 7 dias, sendo que o grupo controle recebeu óleo de canola (veículo do estradiol) na dosagem de 5ml/kg, o grupo estradiol (controle positivo) 0,4mg/kg de benzoato de estradiol, os grupos extrato e infusão receberam, respectivamente, 615,3mg/kg do extrato hidroalcoólico ou 27,0mg/kg da infusão das folhas de *Morus nigra*.

Durante o período de tratamento, verificou-se diariamente a massa corporal e a citologia vaginal. No 8º dia, foi verificada a massa corporal das ratas e efetuada anestesia com tiletamina e zolazepam (Zoletil®) na dose de 20mg/kg, por via intramuscular, com posterior abertura da cavidade abdominal e eutanasia por ruptura do diafragma. Foram retirados útero, fígado, rins e adrenais. A massa de cada órgão foi mensurada e comparada à massa corporal de cada fêmea para cálculo da massa relativa. O útero teve sua massa avaliada úmido (com líquido/secreções no interior) e posteriormente, seco (perfurado /drenado e comprimido entre duas folhas de papel filtro).

4.3.2 Ensaio uterotrófico em ratas pré-púberes

Foram constituídos aleatoriamente quatro grupos experimentais (N=32) de ratas com 21 dias de vida (n=8/ grupo). As ratas foram tratadas, diariamente, por via oral, com sonda rígida, por um período de 3 dias (desde o 21º dia até o 24º dia de vida), sendo que o grupo controle recebeu óleo de canola (veículo do estradiol) na dosagem de 5ml/kg, o estradiol (controle positivo) 0,4mg/kg de benzoato de estradiol, os grupos extrato e infusão receberam, respectivamente, 615,3mg/kg do extrato hidroalcoólico ou 27,0mg/kg da infusão das folhas de *Morus nigra*.

Durante o período de tratamento, verificou-se diariamente a massa corporal e, no 4º e último dia de experimento, foi efetuada anestesia com tiletamina e zolazepam (Zoletil®) na dose de 20mg/kg, por via intramuscular, com posterior abertura da cavidade abdominal e eutanasia por ruptura do diafragma. Posteriormente, foram retirados útero, fígado, rins e adrenais. A massa de cada órgão dos animais utilizados foi mensurada e relacionada com a massa corporal correspondente ao 4º dia de experimento. O útero teve sua massa avaliada úmida e posteriormente, seca entre duas folhas de papel filtro.

4.3.3 Ensaio pubertal em ratas

Os grupos experimentais (N=40) foram constituídos por ratas de 21 dias de idade (n=10/grupo). O grupo controle foi tratado com óleo de canola na dosagem de 5ml/kg, o controle positivo com benzoato de estradiol na dosagem de 0,4mg/kg e 615,3mg/kg de extrato hidroalcoólico ou 27,0mg/kg da infusão de *Morus nigra*.

Os tratamentos foram administrados por via oral através de sonda rígida (dos 21 aos 39 dias) e flexível (a partir dos 40 dias) até a abertura do canal vaginal. A ocorrência ou não do evento foi observada diariamente bem como a massa corporal dos animais e, a partir do dia de abertura do canal vaginal, a fase do ciclo estral das fêmeas foi verificada diariamente através da citologia vaginal. O material vaginal coletado foi observado a

fresco em microscópio óptico com aumento de 100 vezes. A partir do terceiro estro, foi efetuada anestesia com tiletamina e zolazepam (Zoletil®) na dose de 20mg/kg, por via intramuscular, com posterior abertura da cavidade abdominal e eutanasia por ruptura do diafragma. Posteriormente, foram retirados útero, fígado, rins e adrenais. A massa de cada órgão dos animais utilizados foi verificada e comparada à massa corporal correspondente ao último dia de experimento. O útero teve sua massa avaliada úmida e posteriormente, seca entre duas folhas de papel filtro.

4.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como frequência absoluta ou relativa (porcentagem), média e erro padrão da média, conforme a variável proposta.

A análise estatística foi efetuada por meio de testes de análise de variância de medidas repetidas (ANOVA de MR), análise de variância por uma via (ANOVA) e teste qui-quadrado (ZAR, 1999).

As variáveis quantitativas (que apresentaram uma distribuição normal) referentes à influência do extrato e da infusão das folhas de *Morus nigra* no desenvolvimento ponderal das ratas foram comparadas por meio da análise de variância de medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni quando indicado. A massa relativa dos órgãos foi comparada por meio da análise de variância de uma via, seguida do teste de Bonferroni quando indicado.

As variáveis qualitativas (que apresentaram uma distribuição normal) referentes à influência do extrato e da infusão das folhas de *Morus nigra* no ciclo estral foram avaliadas mediante o teste qui-quadrado.

Todas as análises foram feitas prevendo um nível α de significância de 0,05. No texto, foram citados os níveis de significância (P) alcançados em cada teste estatístico realizado.

Os programas utilizados para efetuar a análise estatística foram o SPSS *for Windows* 8.0 e o EXCEL 4.0 (LAPPONI, 1995).

5. Resultados

5.1 Ensaio uterotrófico em ratas adultas ovariectomizadas A Figura 4 mostra o desenvolvimento ponderal (%) das ratas adultas ovariectomizadas tratadas durante sete dias com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato ou infusão de *Morus nigra*.

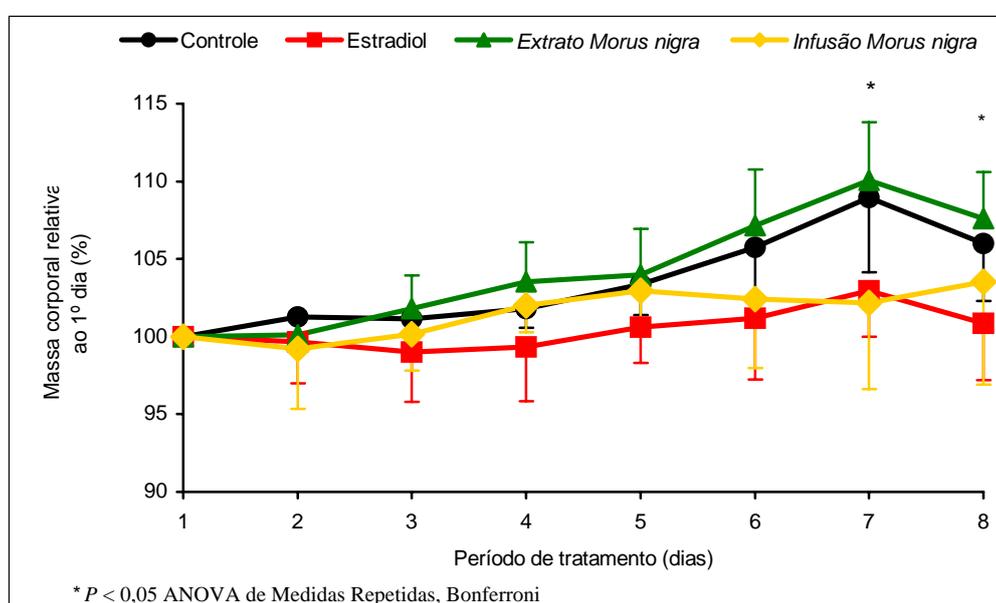


FIGURA 4. Desenvolvimento ponderal em percentual (massa corporal em gramas do 1º dia = 100%) das ratas ovariectomizadas durante o período de tratamento. Os marcadores representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=7).

Verificou-se que durante o período de tratamento, houve um aumento significativo na massa corporal relativa dos grupos controle e extrato de *Morus nigra* em relação aos demais grupos ($P < 0,05$: ANOVA de Medidas Repetidas, Bonferroni) estradiol (controle positivo) e infusão de *Morus nigra*, nos últimos dias do período experimental (dias 7 e 8).

A Figura 5 mostra a massa relativa do útero úmido e seco das fêmeas adultas ovariectomizadas dos grupos óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo),

extrato ou infusão de *Morus nigra*. Verificou-se uma diferença significativa ($P < 0,005$: ANOVA, Bonferroni) na massa relativa do útero úmido e seco dos grupos estradiol e infusão de *Morus nigra* em relação aos grupos controle (óleo de canola) e extrato de *Morus nigra*.

Foi verificada ainda, diferença significativa ($P < 0,005$: qui-quadrado) no percentual de dias estrogênicos, na qual o grupo estradiol apresentou retorno a atividade estrogênica em 65,6% dos dias avaliados em relação aos grupos controle (óleo de canola), infusão e extrato das folhas de *Morus nigra*, que não exibiram atividade estrogênica no período avaliado.

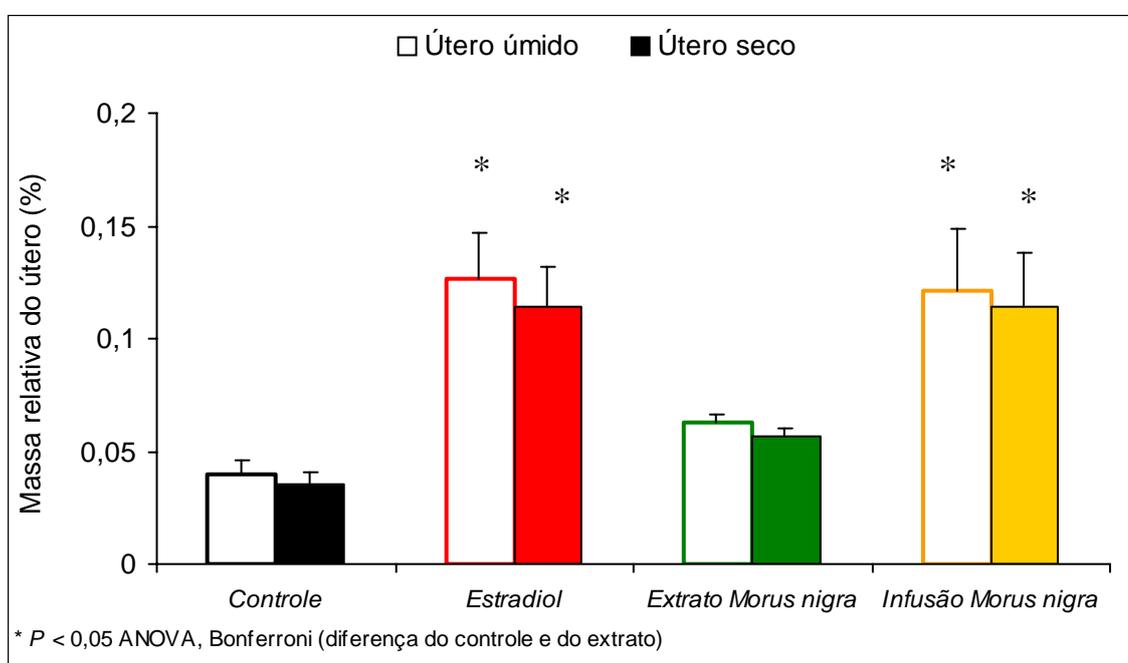


FIGURA 5. Massa relativa (%) do útero úmido e seco das fêmeas adultas ovariectomizadas tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão das folhas de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=7).

A Figura 6 mostra a massa relativa do fígado dos animais tratados com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato ou infusão de *Morus nigra*. Conforme os dados, verifica-se que houve redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$: ANOVA, Bonferroni) na massa relativa do fígado do grupo infusão de *Morus nigra* em relação aos demais grupos experimentais (controle e extrato de *Morus nigra*).

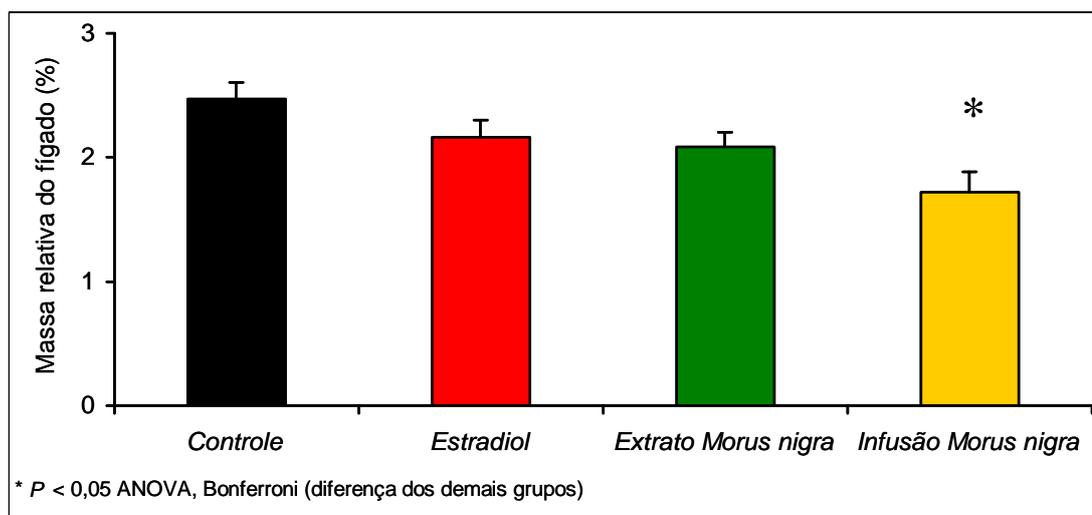


FIGURA 6. Massa relativa do fígado (%) das fêmeas tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão das folhas de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=7).

A Figura 7 mostra a massa relativa dos rins das ratas adultas ovariectomizadas tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato ou infusão de *Morus nigra*. Conforme os dados, verifica-se que houve redução estatisticamente significativa ($P < 0,05$: ANOVA, Bonferroni) na massa relativa dos rins do grupo infusão de *Morus nigra* em relação aos demais grupos experimentais (controle e extrato de *Morus nigra*).

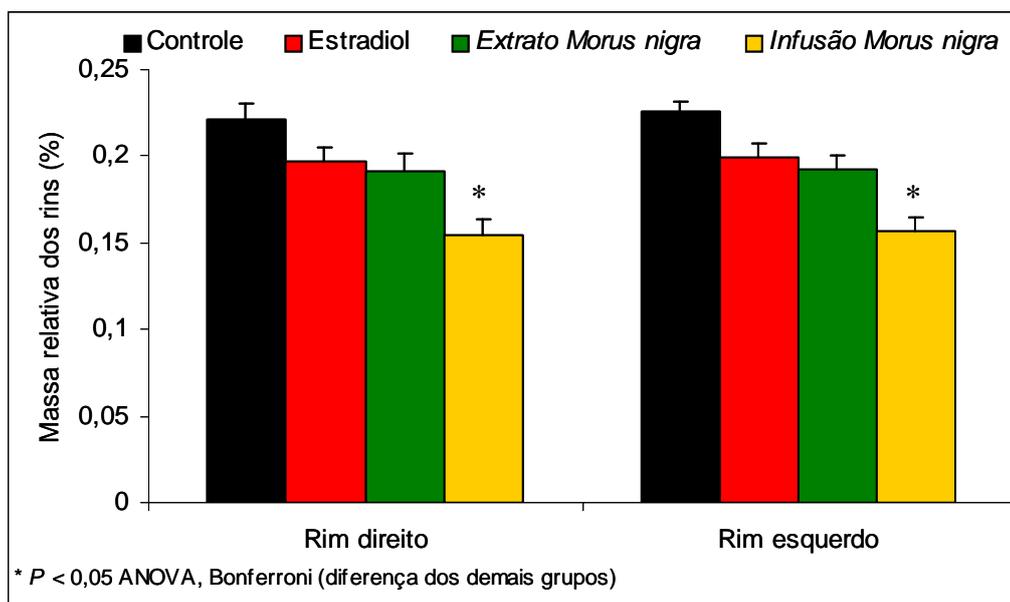


FIGURA 7. Massa relativa (%) dos rins de ratas adultas ovariectomizadas referentes aos grupos experimentais tratados com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=7).

A Figura 8 mostra a massa relativa das adrenais das ratas adultas ovariectomizadas tratadas com óleo de canola, estradiol, extrato e infusão de *Morus nigra*. Quanto à massa relativa das adrenais, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($P > 0,05$: ANOVA).

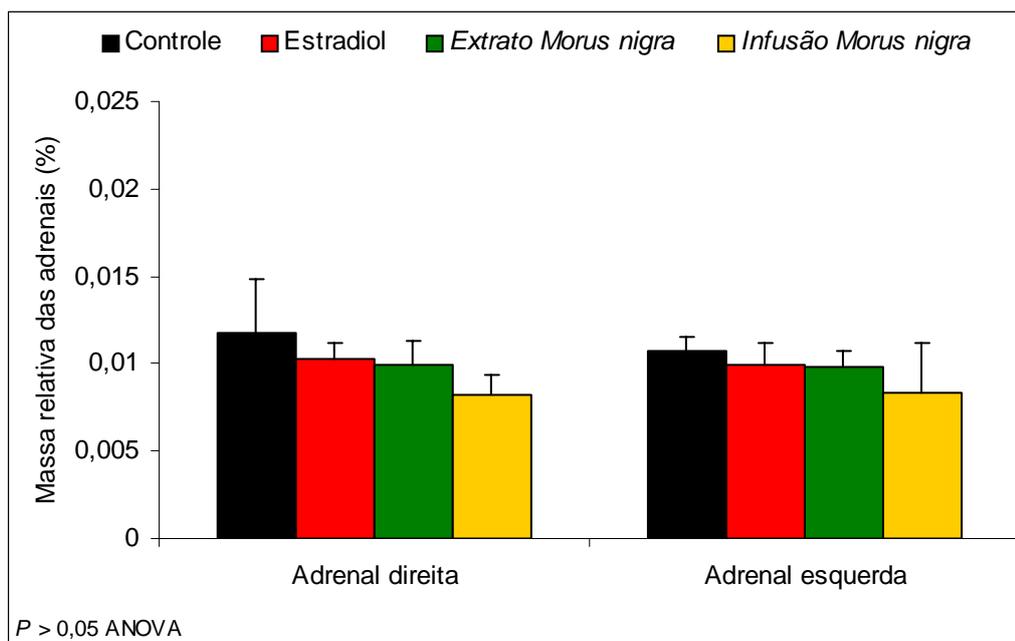


FIGURA 8. Massa relativa (%) das adrenais de ratas adultas ovariectomizadas referentes aos grupos experimentais tratados com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=7).

5.2 Ensaio uterotrófico em ratas pré-púberes

Na Figura 9 são apresentadas as massas corporais relativas ao longo do período de tratamento, onde pode-se verificar que houve diferença significativa ($P < 0,001$: ANOVA de Medidas Repetidas, Bonferroni), na qual o grupo infusão de *Morus nigra* apresentou maior ganho em relação ao grupo tratado com óleo de canola (controle) e estradiol (controle positivo), evidenciado no terceiro dia de tratamento, mas não se diferenciou do grupo tratado com o extrato de *Morus nigra*.

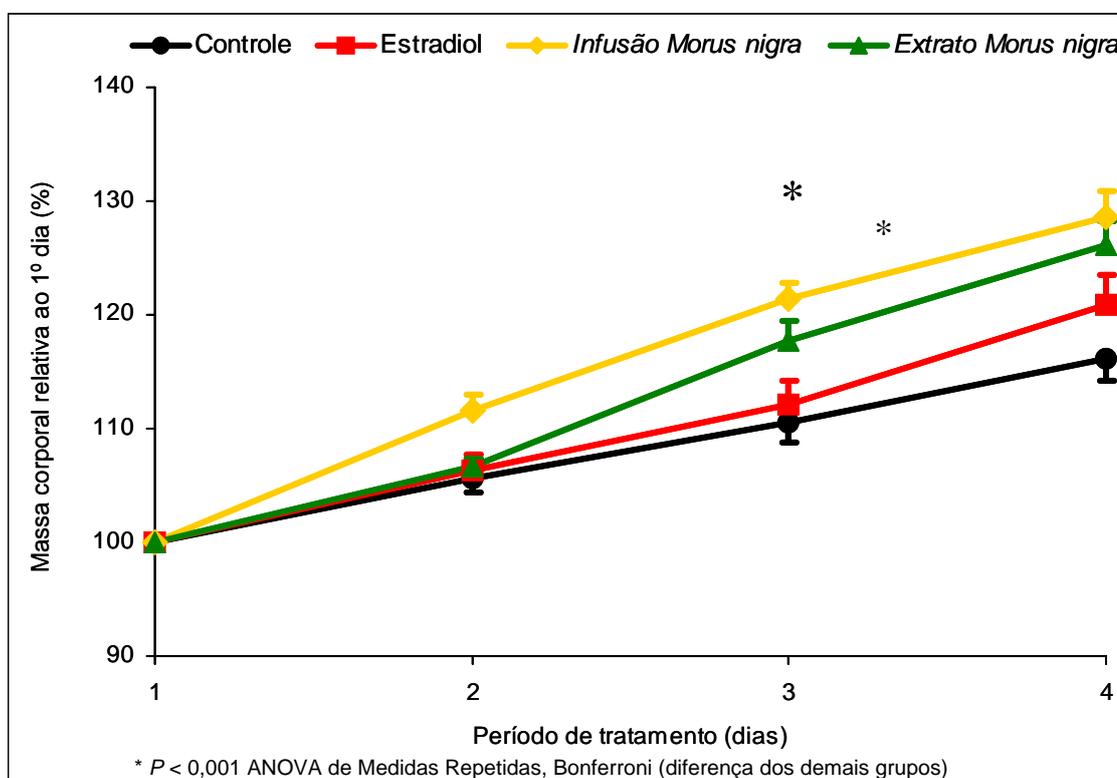


FIGURA 9. Desenvolvimento ponderal de ratas pré-púberes durante o período experimental dos grupos tratados com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *M. nigra*. Os marcadores representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=8).

Conforme os dados apresentados na Figura 10, pode-se verificar que houve diferença significativa ($P < 0,001$: ANOVA, Bonferroni) na massa relativa do útero úmido e seco, do grupo estradiol (controle positivo) em relação aos demais (óleo de canola, infusão e extrato de *Morus nigra*).

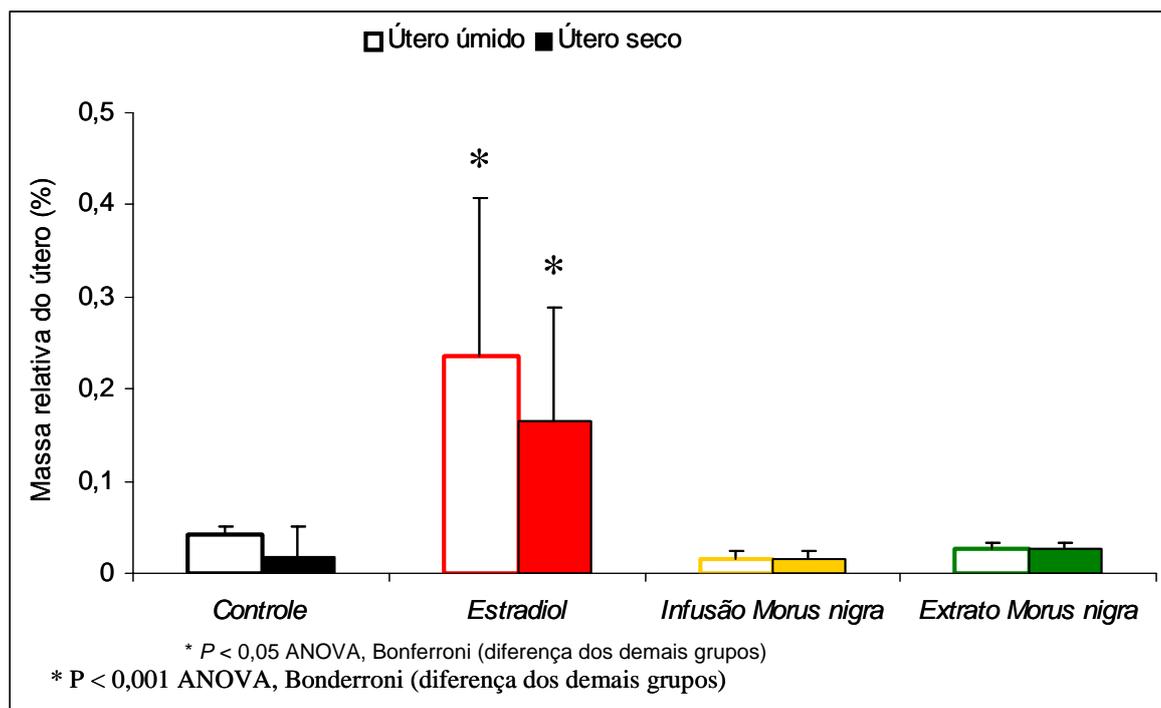


FIGURA 10. Massa relativa uterina (%) das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *M. nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=8).

A massa relativa do fígado dos animais em estudo está representada na Figura 11. Verifica-se que não houve variação estatisticamente significativa na massa relativa deste órgão ($P > 0,05$: ANOVA) para os grupos avaliados (óleo de canola, estradiol, infusão e extrato de *Morus nigra*).

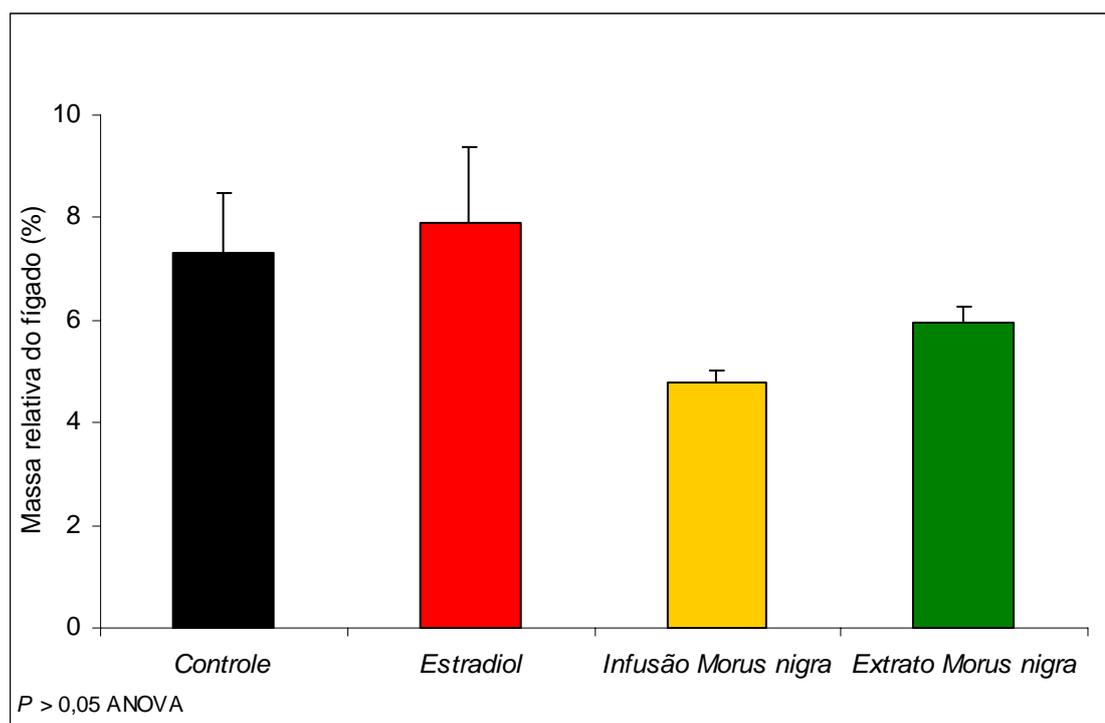


FIGURA 11. Massa relativa do fígado das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=8).

A Figura 12 mostra a massa relativa dos rins das ratas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *Morus nigra*. Verifica-se que os órgãos mencionados não sofreram variações significativas entre os grupos ($P > 0,05$: ANOVA).

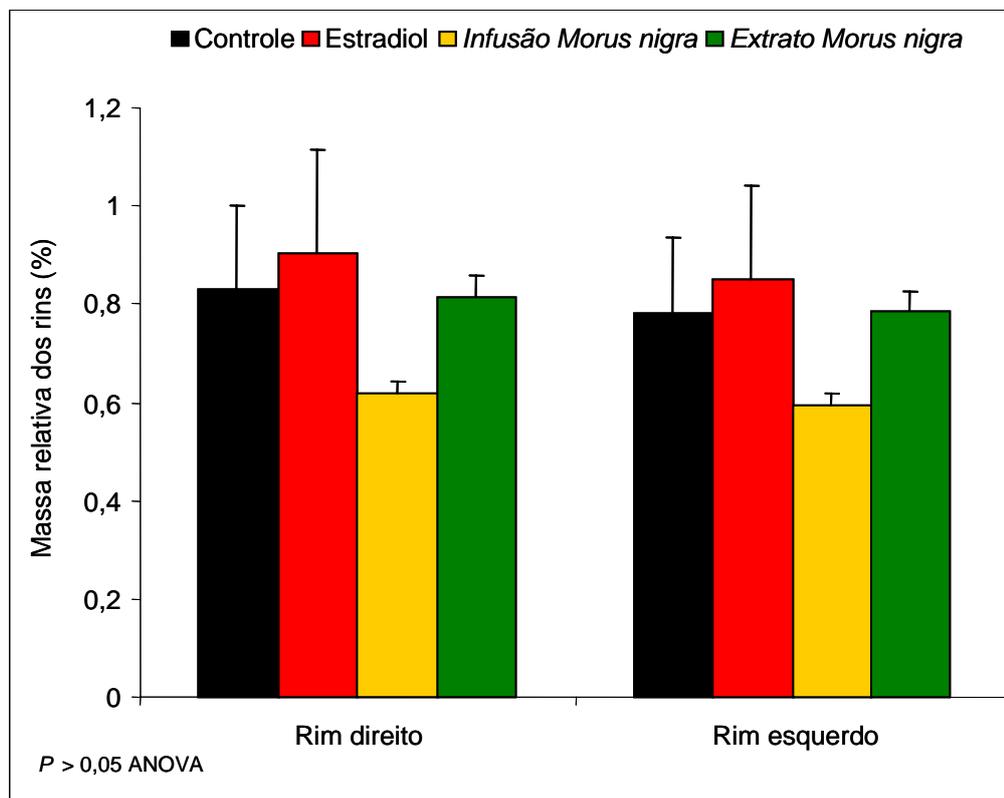


FIGURA 12. Massa relativa dos rins das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=8).

A Figura 13 mostra a massa relativa das adrenais das ratas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *Morus nigra*. Verifica-se que estes órgãos não sofreram variações significativas entre os grupos ($P > 0,05$: ANOVA).

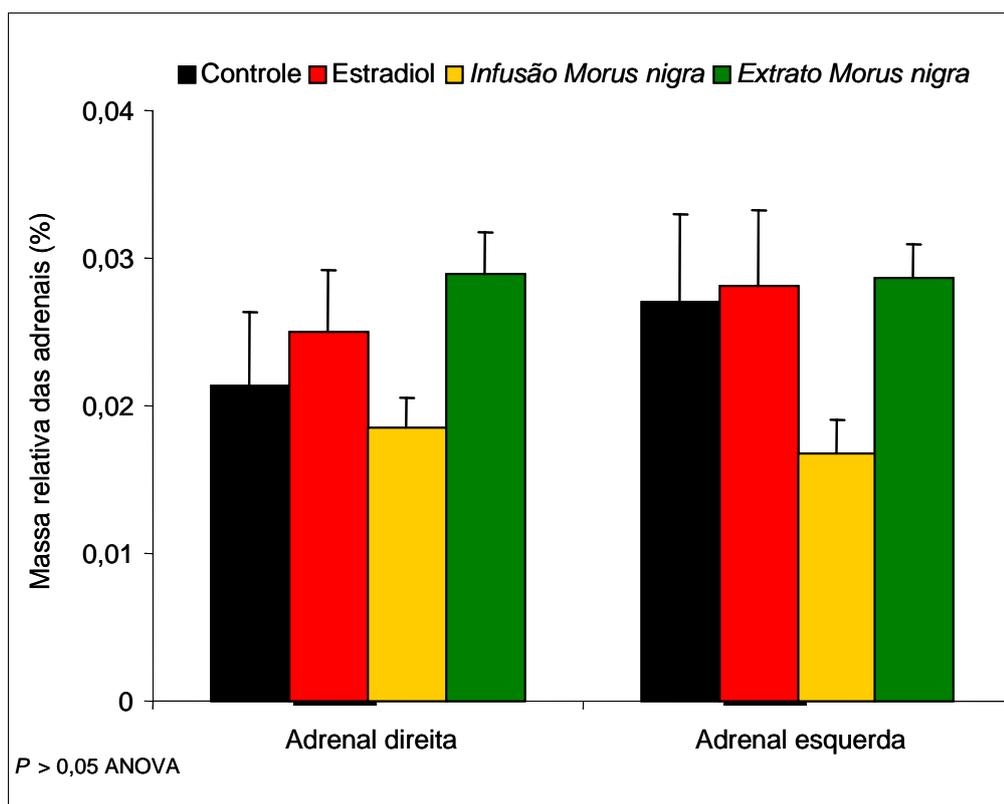


FIGURA 13. Massa relativa das adrenais das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=8).

5.3 Ensaio pubertal em ratas

A Figura 14 mostra a massa corporal relativa das ratas tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra* ao longo dos dias de tratamento. Verifica-se que não houve diferença significativa entre os grupos.

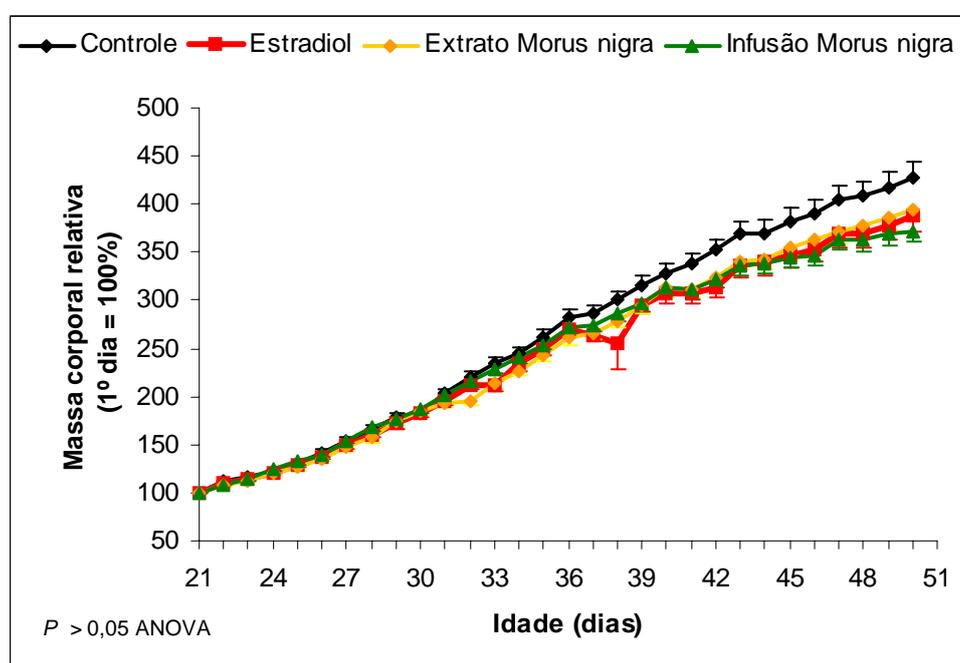


FIGURA 14. Desenvolvimento ponderal em percentual (massa corporal em gramas do 1º dia = 100%) das ratas pré-púberes durante o período de tratamento. Os marcadores representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=10).

Na Figura 15, verifica-se que não houve diferença significativa na massa relativa do útero úmido e seco das ratas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra* ao longo dos dias de tratamento.

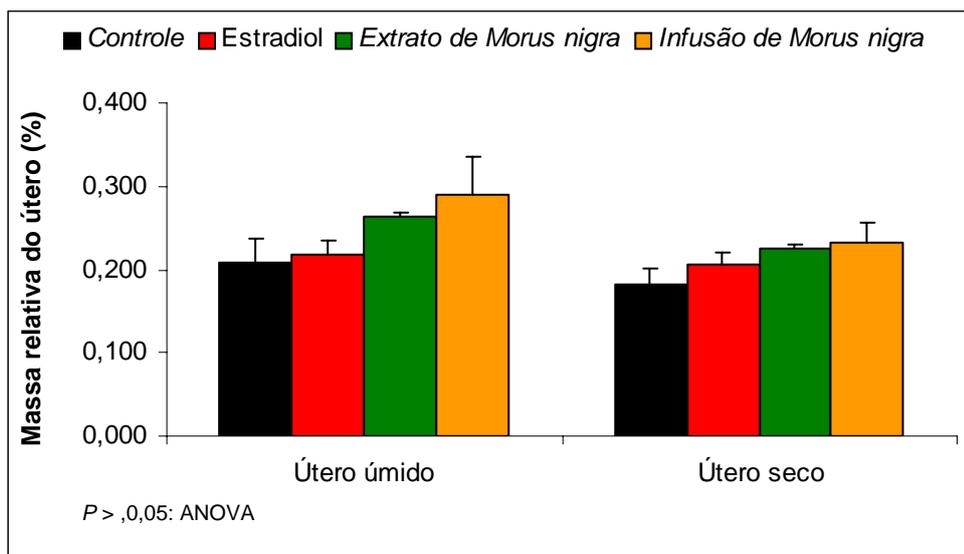


FIGURA 15. Massa relativa do útero úmido e útero seco das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=10).

A Figura 16 mostra a massa relativa dos ovários das ratas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. Quanto à massa dos ovários, os resultados demonstram uma redução significativa ($P < 0,05$: ANOVA, Bonferroni) na massa relativa (média \pm erro padrão) do grupo Estradiol ($0,038 \pm 0,001\%$) em relação aos demais: Controle ($0,047 \pm 0,002\%$), Extrato de *Morus nigra* ($0,056 \pm 0,001\%$) e Infusão de *Morus nigra* ($0,060 \pm 0,002\%$).

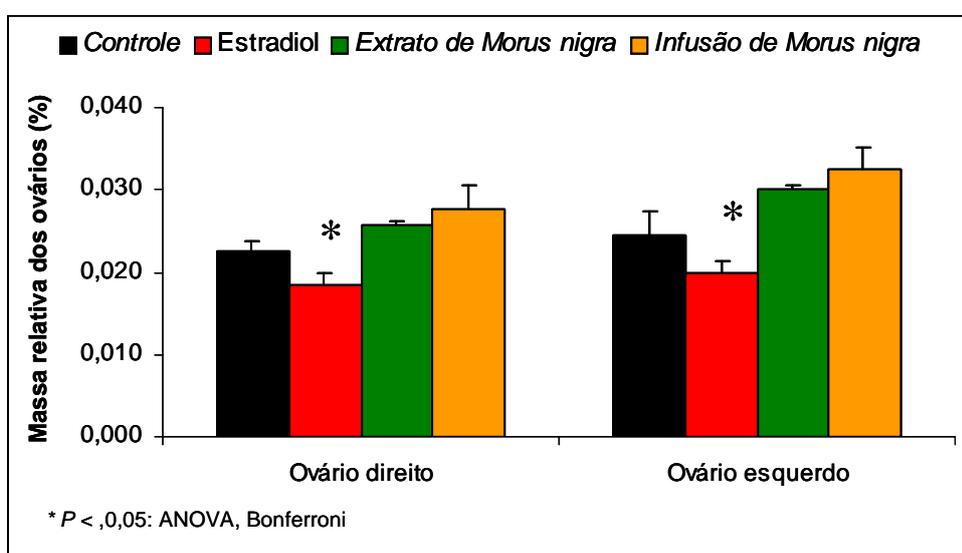


FIGURA 16. Massa relativa do ovário direito e ovário esquerdo das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=10).

A Figura 17 mostra a massa relativa do fígado dos animais tratados com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. A análise estatística confirma que houve aumento significativo ($P < 0,05$: ANOVA, Bonferroni) na massa do órgão em fêmeas tratadas com estradiol.

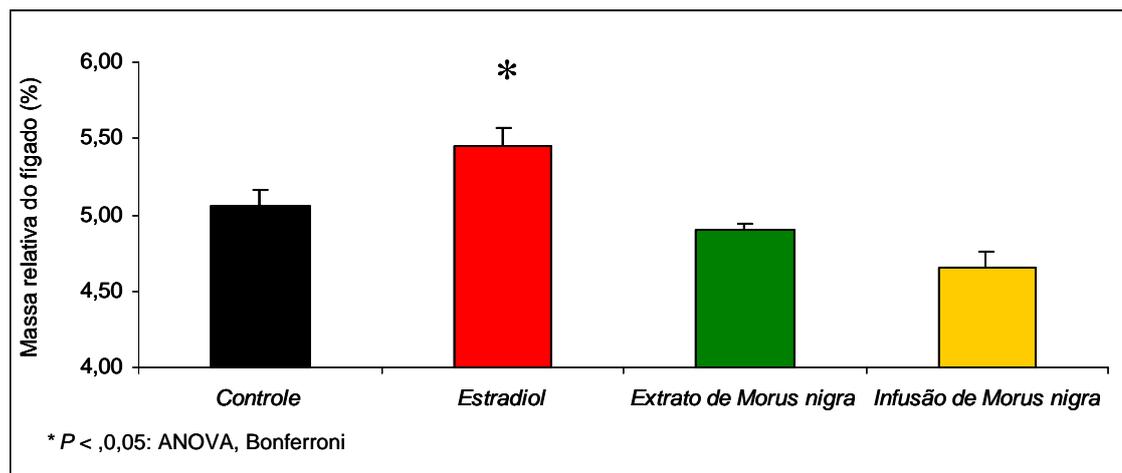


FIGURA 17. Massa relativa do fígado das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=10).

A Figura 18 mostra a massa relativa dos rins das ratas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. Verifica-se que o grupo estradiol (controle positivo) apresentou um aumento significativo na massa relativa do rim direito ($P > 0,05$: ANOVA, Bonferroni) em relação ao grupo controle.

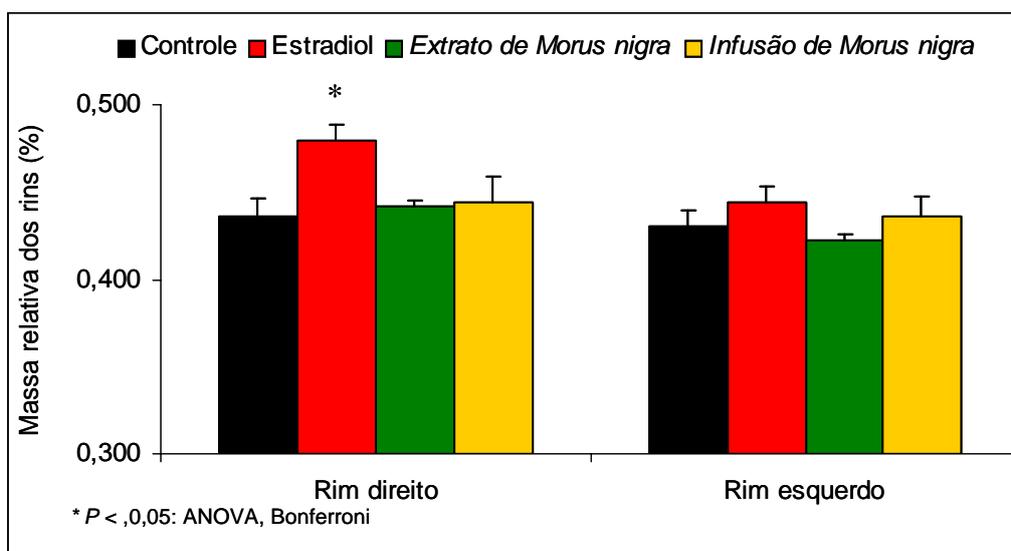


FIGURA 18. Massa relativa dos rins das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=10).

A Figura 19 mostra a massa relativa das adrenais das ratas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. Observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa com relação à estes órgãos.

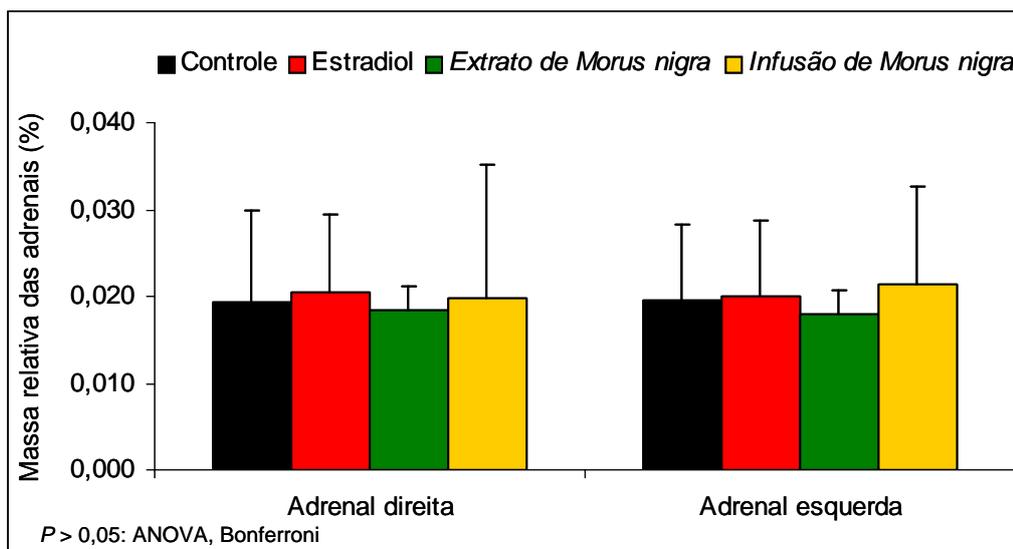


FIGURA 19. Massa relativa das adrenais das fêmeas pré-púberes tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), extrato e infusão de *Morus nigra*. As colunas representam as médias e as barras os respectivos erros padrões (n=10).

A Figura 20 mostra a idade média na abertura do canal vaginal (em dias) das ratas pré-púberes tratadas diariamente do 21º dia até o 3º estro após a ocorrência do evento. A abertura do canal vaginal foi antecipada no grupo estradiol ($25,1 \pm 0,1$ dias) em relação aos demais grupos e, apesar do atraso manifestado pelo grupo infusão de *Morus nigra* ($35,7 \pm 0,8$ dias) em relação aos grupos: controle ($33,6 \pm 0,5$ dias) e extrato de *Morus nigra* ($32,9 \pm 0,5$ dias), este período é semelhante ao observado em controles históricos do mesmo laboratório (DALLEGRAVE, 2003).

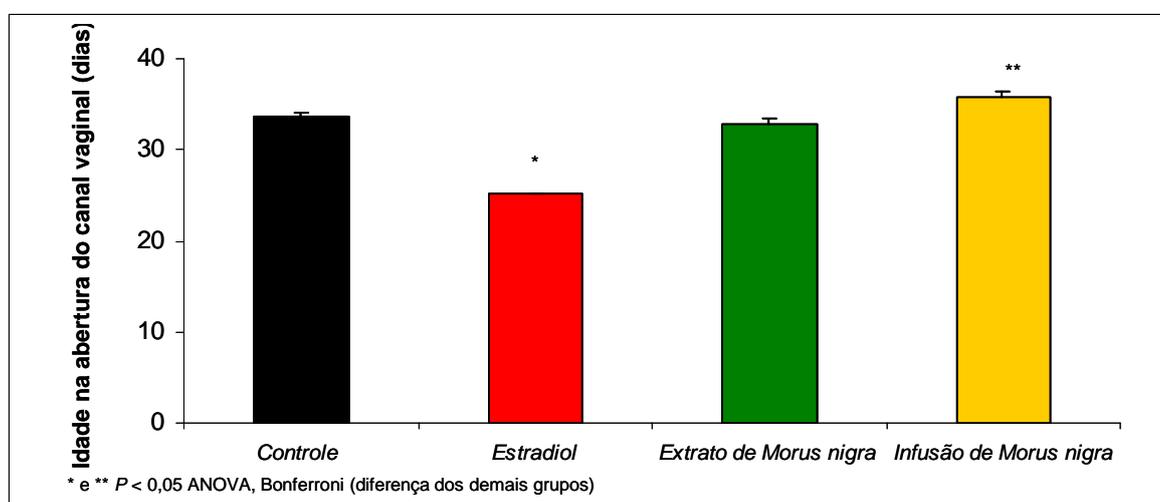


FIGURA 20. Idade média na abertura do canal vaginal (dias) das ratas tratadas com óleo de canola (controle), estradiol (controle positivo), infusão e extrato de *Morus nigra*. As colunas representam a idade média (dias) e as barras os erros padrões (n=10).

Através da análise da Figura 21, verifica-se que não houve diferença significativa entre os grupos analisados quanto à regularidade do ciclo estral no período avaliado.

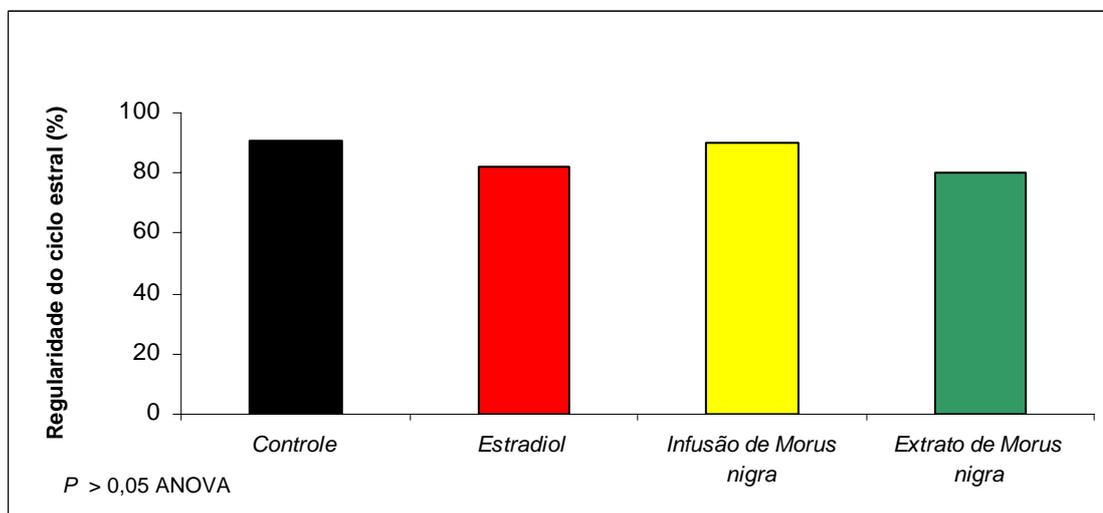


FIGURA 21. Regularidade do ciclo estral (%) das ratas tratadas com óleo de canola (controle), estradiol, infusão e extrato de *Morus nigra*. As colunas representam o percentual de fêmeas com o ciclo regular (n=10).

6. DISCUSSÃO

O conjunto de resultados obtidos no presente trabalho sugere a ausência de atividade fitoestrogênica do extrato hidroalcoólico e da infusão das folhas de *Morus nigra* (quando administrados diariamente nas doses de 615,3mg/kg e 27,0mg/kg, respectivamente) em ratas pré púberes e ratas adultas ovariectomizadas.

No ensaio referente às ratas ovariectomizadas, o aumento de massa corporal dos grupos tratados com óleo de canola (controle) e extrato de *Morus nigra* é padrão esperado para ratas nesta fase de vida (70 dias) e também como resposta à ovariectomia. Já o grupo tratado com estradiol, não manteve o aumento de massa corporal esperado para a fase de vida (70 dias), provavelmente em decorrência da suplementação hormonal pelo mesmo. Considerando que a ovariectomia é um procedimento que induz aumento de massa corporal devido à remoção abrupta e permanente dos hormônios femininos, tal efeito pode ter sido alterado pela reposição do estradiol, que retoma os níveis estrogênicos e seus efeitos. Os efeitos estrogênicos foram confirmados pelo aumento na massa relativa do útero úmido e seco e pelos sinais de estro. As fêmeas tratadas com a infusão de *Morus nigra*, de forma semelhante ao grupo estradiol, não tiveram um aumento de massa corporal esperado para a fase de vida e também em resposta à ovariectomia. Entretanto o aumento da massa relativa do útero úmido e seco igualmente evidenciado neste grupo, não foi acompanhado de sinais de estro, revelando assim, uma resposta estrogênica parcial. Considerando a possível existência de estrona nas folhas de *Morus nigra* (COSMO ON LINE, 2004), e que esta, possui 40% da ação do estradiol, a resposta parcial evidenciada pode ser decorrente da ação deste tipo de fitoestrógeno. De forma similar, efeitos estrogênicos são relatados para isoflavonas, onde afinidades específicas em relação aos receptores estrogênicos alfa e beta justificam respostas parciais em órgãos alvo (BAKER *et al.*, 2000; VINCENT & FITZPATRICK, 2000; DUNCAN *et al.*, 1999).

Considerando que o tratamento com a infusão das folhas de *Morus nigra* manifestou também, uma redução na massa relativa de fígado e rins, pode-se sugerir que um possível efeito diurético tenha contribuído para a redução destes órgãos, que são altamente irrigados, e conseqüentemente, mais suscetíveis a alterações hemodinâmicas.

Relatos de uso tradicional apontam certas plantas da família *Moraceae* como diuréticas, o que não descarta a mesma atividade para *Morus nigra* (NOELLI, 1996).

O ensaio uterotrófico em fêmeas pré-púberes, revelou um aumento na massa relativa do útero úmido e seco somente para o grupo tratado com o estradiol. Portanto, os grupos tratados com a infusão ou com o extrato hidroalcoólico de *Morus nigra*, não manifestaram atividade estrogênica por este modelo. Houve apenas um leve aumento de massa corporal no grupo tratado com a infusão de *Morus nigra*, porém este não é diferente daquele observado em controles históricos do mesmo laboratório (DALLEGRAVE, 2003).

No ensaio pubertal, de maior duração que os demais, os grupos tratados com a infusão ou com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Morus nigra*, não revelaram alterações significativas na massa corporal e massa relativa dos órgãos, em relação ao grupo controle. O grupo estradiol manifestou uma antecipação da abertura do canal vaginal em relação aos demais grupos, conforme esperado para resposta estrogênica em fêmeas pré-púberes submetidas a terapia com estradiol. Entretanto, as fêmeas tratadas com a infusão das folhas de *Morus nigra* revelaram um atraso na idade da abertura do canal vaginal em relação aos demais grupos, porém este, não pode ser considerado efeito anti-estrogênico, já que o período de ocorrência desta característica é semelhante ao evidenciado em outros ensaios realizados no mesmo laboratório (DALLEGRAVE, 2003). Já a redução significativa dos ovários manifestada pelo grupo tratado com o estradiol, reflete a retroalimentação negativa esperada pela suplementação hormonal prolongada (GUYTON, 2002).

O aumento da massa relativa de fígado e rins, no grupo tratado com estradiol, pode ser justificado pela ação edematogênica deste hormônio, além do aumento da atividade metabólica dos mesmos com finalidades de eliminação (GUYTON, 2002; SILVA, 2002).

Os diferentes protocolos escolhidos para avaliar a possível atividade estrogênica das folhas de *Morus nigra* em ratas são internacionalmente aceitos. As principais variáveis preconizadas pela OECD (JUN KANNO, 2001) para estes ensaios são: o aumento da massa uterina, a antecipação da abertura do canal vaginal, a indução de estro em ratas pré-púberes e adultas ovariectomizadas. Sendo assim, não foram observadas alterações significativas relacionadas às variáveis mencionadas para animais tratados com a infusão e o extrato das folhas de *Morus nigra*, em comparação ao ocorrido com os animais tratados com estradiol. Apenas as fêmeas tratadas com a

infusão das folhas de *Morus nigra* apresentaram um aumento na massa relativa uterina no ensaio uterotrófico de fêmeas adultas ovariectomizadas, mas esta atividade não foi sustentada pelo retorno a atividade cíclica, considerando que nenhuma das fêmeas apresentou células queratinizadas em nenhum dos dias de tratamento, observados mediante avaliação do lavado vaginal. Já para o grupo estradiol (controle positivo), conforme o esperado para avaliação estrogênica, observou-se o aumento da massa uterina de fêmeas pré-púberes e ovariectomizadas, a indução da presença de células queratinizadas nos esfregaços vaginais de fêmeas ovariectomizadas (caracterizando o retorno a atividade cíclica) e a antecipação da abertura do canal vaginal em fêmeas pré-púberes.

Supostos efeitos das folhas de *Morus nigra* provém dos relatos da terapêutica popular em humanos, que apontam a sua eficácia para o tratamento dos sinais e sintomas da menopausa, e inclusive utilizam-se do comércio das mesmas como medicamento, ou mesmo preconizam sua utilização em forma de infusão (EMBRAFARMA, FARMATTIVA 2006). O eventual sucesso de tal terapêutica deve-se possivelmente aos fatores relacionados a seguir:

a) Efeito placebo: Em medicina humana, sugere-se a prescrição médica de um "placebo" em caso de pacientes com doenças imaginárias crônicas ou porque não há tratamento apropriado para o tipo de doença diagnosticada. O "placebo" são pílulas de açúcar ou outras preparações sem medicamento. Em muitos casos o placebo demonstra ser eficaz na redução ou eliminação de sintomas físicos, incluindo doenças para as quais não existe cura conhecida. Os únicos ingredientes ativos do tratamento parecem ser as expectativas positivas que os pacientes têm: (a) de acreditar no médico, (b) e, em consequência, de receber um tratamento adequado (MINAYO, 2006). A partir destes conhecimentos, a “crença” na melhora dos sintomas físicos da menopausa a partir de tratamentos diários com a infusão das folhas de *Morus nigra* é um aspecto que deve ser considerado. Analisando-se outros aspectos referentes ao efeito placebo, sabe-se que, qualquer tratamento novo será considerado eficaz se seus resultados suplantarem os do placebo (que mede a evolução natural do processo que se quer tratar) ou igualarem-se aos do tratamento já existente (WANNAMACHER & FUCHS, 2000). Sendo os “fogachos” uma das principais razões da procura das mulheres por terapia de reposição hormonal, os estrogênios são a maior arma contra eles. Como podem se resolver com o

tempo e, também, sofrerem grande influência psicológica, placebos podem melhorá-los (CLAPAUCH et al, 2002);

b) Uso complementar a outros fármacos, estes sim eficazes: O tratamento dos sintomas da menopausa utilizando-se reposição hormonal clássica com certos compostos como o estradiol, é eficiente. Porém, a associação desta terapia à ingestão diária de infusos de plantas popularmente conhecidas como estrogênicas, para complementação no tratamento dos sinais e sintomas da menopausa, ainda não se constituem como uma fonte segura de tratamento, podendo seus efeitos serem confundidos aos do medicamento. Os benefícios clínicos da terapia de reposição hormonal são inegáveis, enquanto que as evidências para recomendar fitormônios como substituto desta são insuficientes (GLAZIER, 2001).

Porém, dentre os componentes ou constituintes isolados nas folhas de *Morus nigra*, mencionam-se alguns de estrutura química semelhante com os fitoestrógenos ou estrógenos animais. Em trabalho publicado recentemente, por meio de análises qualitativas do extrato bruto e de infusos destas folhas, utilizando-se como substrato padrão o estradiol, detectaram-se substâncias semelhantes ao hormônio sexual feminino nos infusos, preparações similares aos chás preconizados popularmente. Entretanto, esta substância de interesse encontra-se ligada a alguma outra estrutura e somente após hidrólise ela é detectada (COUTO et al; 2006). De forma semelhante, acredita-se que a infusão das folhas de *Morus nigra* possa auxiliar na produção de estrona que apresenta 40% da ação do estradiol, hormônio ligado às características sexuais secundárias na mulher, e que deixa de ser produzido pelo ovário no climatério (COSMO ON LINE, 2004). A estrona, como hormônio estrogênico natural, é administrado combinado geralmente com outros estrógenos naturais, como o estriol e estradiol (EMBRAFARMA, 2006). Sabe-se que, com a menopausa, o organismo feminino suspende a função ovariana, com declínio da secreção estrogênica. Do ponto de vista bioquímico, a menopausa caracteriza-se por um declínio do estradiol, estrona e estriol, hormônios mencionados anteriormente, sendo estes dois últimos, considerados estrógenos fracos (YEUNG, 2001, CASTELLI, 1998). Por estes motivos, a ação da estrona presente nas folhas de *Morus nigra* pode ser insuficiente para a detecção da ação fitoestrogênica nestas plantas. Dentre outros compostos, a infusão das folhas de *Morus nigra* apresentam flavonóides e alta quantidade de taninos, sendo estes últimos, substâncias contra-indicadas por promoverem irritação das mucosas digestivas,

principalmente em indivíduos que apresentem gastrite e úlcera gastrointestinal (EMBRAFARMA, 2006).

A atividade estrogênica de plantas foi primeiramente demonstrada em 1926, e em meados da década de 70 já se tinha demonstrado que centenas de plantas exibiam atividade estrogênica. Os fitoestrógenos assumiram importância biológica e econômica nos anos 40, com a diminuição da fertilidade induzida em ovelhas pela ingestão de trevos de pastagens, na Austrália, na chamada "Doença do Trevo" (KNIGHT, 1996). Outros trabalhos realizados com plantas que efetivamente apresentam atividade estrogênica em ruminantes (como o *Trifolium subterraneum*), determinando interferências na gestação e fertilidade, revelaram evidentes efeitos estrogênicos em ratas tratadas com extratos hidroalcoólicos (DALSENTER, 1991) semelhantes aos extratos de *Morus nigra*. Portanto, o método de extração utilizado neste trabalho pode ser considerado adequado para avaliação fitoestrogênica.

Nos ensaios realizados não houve manifestação de efeito anabolizante, fator este, provavelmente decorrente do curto tempo de tratamento, uma vez que este tipo de efeito demoraria duas ou mais semanas para se revelar. Entre os efeitos observados, ao contrário, houve redução da massa corpórea (o que tb está contra o efeito estrogênico pois este, pela retenção de líquidos, determina edema e aumento agudo da massa corpórea). Outros efeitos das folhas de *Morus nigra* em animais são descritos, indicando a utilização de extratos aquosos como eficientes para o acúmulo de glicogênio muscular em ratos Wistar, podendo sugerir que apresentem mecanismo de ação semelhante à insulina ou que atuem sensibilizando receptores de membrana para a glicose (SOUZA *et al.*, 2004). O efeito diurético das folhas de *Morus nigra* apresenta-se descrito em publicações não-científicas, preconizando-se sua utilização em propagandas veiculadas *on line*, por farmácias de manipulação (FARMATTIVA, 2006). Os resultados deste trabalho sugerem uma possível ação diurética da infusão das folhas de *M. Nigra*, uma vez observada a redução da massa relativa de fígado e rins das ratas adultas ovariectomizadas. Relatos do uso tradicional referem a utilização de certas espécies vegetais por populações indígenas e caboclas do Brasil e países vizinhos, fundamentados nos preceitos da etnobotânica e etnofarmacologia. Estes, apontam a utilização das plantas da família *Moraceae* (*Cecropia catharinensis* e *Chlorophora tinctoria*) como potencialmente diuréticas e largamente utilizadas para fins medicinais na farmacologia Guarani (NOELLI, 1996). Desta forma, futuros estudos utilizando

animais experimentais poderão investigar e talvez comprovar a sugerida atividade diurética também das folhas de *Morus nigra*.

Sabe-se que, através de certas “crendices populares” (como no caso a utilização das folhas de *Morus nigra* para o preparo de infusões que amenizam os efeitos da menopausa ou mesmo, que façam a reposição hormonal), algumas evidências positivas podem ser elucidadas para justificar a utilização da fitoterapia em diversas patologias. Segundo, Elisabetsky (2003), como estratégia na investigação de plantas medicinais, a abordagem etnofarmacológica consiste em combinar informações adquiridas junto a usuários da flora medicinal (comunidades e especialistas tradicionais), com estudos químicos e farmacológicos. O método etnofarmacológico permite a formulação de hipóteses quanto à(s) substância(s) ativa(s) responsáveis pelas ações terapêuticas relatadas. Sabe-se que, de cada dez compostos descobertos, quatro seguem para a fase de desenvolvimento, enquanto existe uma taxa de 50% de desistência devido a toxicidade/efeitos adversos, antes mesmo que uma fase clínica I completa seja deslanchada (HARVEY, A.L.,2002). Esses números indicam o valor de relatos de uso tradicional em relação a biodisponibilidade e segurança relativa.

Cabe notar que a etnofarmacologia, por se basear em alegações de utilidade terapêutica e não em determinado perfil químico das espécies (o que, em tese, indicaria a possibilidade de interação com um determinado alvo biológico), é particularmente útil no caso de categorias de doenças cuja patofisiologia não é bem conhecida. A mesma linha de raciocínio pode ser aplicada com relação à descoberta de produtos protótipo (com mecanismos de ação inovadores): a abordagem mecanicista baseia-se na interação dos compostos com alvos farmacodinâmicos predeterminados, enquanto que a etnofarmacologia por partir de relatos de efeitos, pode levar a identificação de produtos com mecanismos de ação sequer conhecidos. Por isso, modelos *in vivo* tem papel importante nos estudos etnofarmacológicos (ELISABETSKY, 2002).

Outros efeitos relatados para *Morus nigra* ou *Morus alba*, como por exemplo, efeito anti-hiperglicêmico (HOSSEINZADEH & SADEGUI, 1999), atividade antinociceptiva (DE SOUZA M.M,2000), catártica, analgésica, antitussígenas, entre outras, (YAMATAKE Y, 1976) não referem a atividade estrogênica em ratas. Sendo assim, este trabalho mostra que não há, até as dosagens referidas por via oral durante o período dos modelos propostos pela OECD, atividade hormonal característica no extrato hidroalcoólico ou infusão das folhas de *Morus nigra*.

7. CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico 50% e a infusão de *Morus nigra*, administrados via oral diariamente, nas doses referidas durante os ensaios com ratas Wistar ovariectomizadas e pré-púberes, não interferiram significativamente no desenvolvimento ponderal e massa relativa dos órgãos avaliados, bem como nas variáveis referentes ao ciclo estral das fêmeas, descartando, desta forma, a atividade fitoestrogênica das folhas. Os tratamentos não afetaram o desenvolvimento uterino das ratas adultas ovariectomizadas, e também não influenciaram nas manifestações das características sexuais secundárias tais como: abertura do canal vaginal e desenvolvimento uterino das ratas pré-púberes, bem como na abertura do canal vaginal e no ciclo estral das ratas pré-púberes tratadas do desmame à puberdade em ensaios subcrônicos. Sendo assim, sugere-se que o extrato hidroalcoólico e a infusão das folhas de *Morus nigra* não interferem diretamente no desenvolvimento uterino de ratas Wistar ovariectomizadas e pré-púberes, variável utilizada como referência para a comprovação de atividade fitoestrogênica dos tratamentos, não interferindo, também, nas demais variáveis observadas ao longo dos três ensaios biológicos considerados. Dentro deste contexto torna-se evidente a necessidade de mais estudos que busquem o perfil fitoquímico de diferentes extratos das folhas de *Morus nigra*, como também, ensaios biológicos em modelos animais visando elucidar possíveis ações terapêuticas e/ou confirmar a ausência de potencial estrogênico referido pela cultura popular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLERCREUTZ H, AMALAINEN E, GRORBACH S, GOLDIN B. Dietary phytoestrogens and the menopause in Japan. *Lancet* 1992; 339:1233

AGNUSDEI D, BUFALINO L. Efficacy of ipriflavone in established osteoporosis and long-term safety. *Calcif Tissue Int* 1997; 61 (Suppl 1): S23-7.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Regulamento técnico para produtos para o preparo de infusão e decocção**. Consulta pública nº 83, de 13 de Dezembro de 2004. Disponível em www.anvisa.gov.br Acesso em: 10 nov. 2006.

ANDALU, N CH VARDACHARYULU. Effect of Mulberry leaves on diabetes. *Int. J. Diab. Dev. Countries* 2001, vol. 21.

BAKER VL, LEITMAN D, JAFFE RB. Selective estrogen receptor modulators in reproductive medicine and biology. *Obstet Gynecol Surv* 2000; 43: 162-83.

BALMÉ, F. **Plantas Medicinai**s. São Paulo:Hemus, 5 ed. , 991. 398 p.

BENIGNI, R, CAPRA, C, et al. **Medicinali Chimica, Farmacologia e Terapia**. Milano: Inverni & Della Beffa,1962, pp.644-5.

BÉZANGER-BEAUQUESNE,L; et al. **Plantes Médicinales des Regions Tempérées**. Paris: Maloine, 1980, p.209.

CAMARGO, M. T. R. De A. **Contribuiciones a los estudios etnofarmacobotánicos de espécies vegetales usados en los ritos afrobrasileiros**. Caracas: Ed. Arte, 1998.

CASTELLI, W.P. Cardiovascular disease in women. *Am J Obstet Gynecol*. 1998, 158, 1552-60.

*CD-Rom de Plantas Medicinai*s - UFV/FUNARBE, Agromídia Software Ltda. Site: <http://www.funarbe.org.br/> .

CHAHOU, I; KWASIGROCH, E. Controlled breeding of laboratory animals. In: NEUBERT, D.; MERKER, J.; KWASIGROCH, T. E. *Methods in prenatal toxicology*. Berlin: **Georg Thieme Publishers** Stuttgart, 1977. p. 78-91.

CHATERJEE, G K, BURMANTR, NAGCHAUDHURIAK, PAL SP. Antiinflammatory and antipyretic activities of *Morus indica*. *Planta Med*; 48 (2):116-9, 1983.

CLAPAUCH, Ruth et al . Fitoestrogênios: posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arq Bras Endocrinol Metab.**, São Paulo, v. 46, n. 6, 2002.

CLARKSON TB, ANTHONY MS, MORGAN TM. Inhibition of postmenopausal atherosclerosis progression: a comparison of the effects of conjugated equine estrogens and soy phytoestrogens. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86 (1): 41-7.

COBEA – COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2.ed. São Paulo: H.A. Rothschild, 1996. 259p.

COMINO R. Terapia hormonal substitutive. Tibolona. SERMs y cáncer de mama. Medicina baseada en la evidencia. En: Palacios S, Editor. **Cerebro y mujer. Avances en Ginecología Endocrinológica**. Madrid: Health Research Consulting; 1999: 139-146.

COSMO ON LINE. **As alternativas para viver a menopausa**, 2004. Disponível em: www.cosmo.com.br. Acesso em:23 jun.2004.

COUTO, V.S; HEINEN, T.E. et al. Identificação de compostos esteróides nas folhas de *Morus nigra*. **FeSBE**, 2006.

DALSENTER, P.R. **Efeitos dos extratos de *Trifolium riograndense* Bukart sobre a fertilidade de ratas albinas**. Porto Alegre: UFRGS, 1991. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DALLEGRAVE, E. **Influência dos extratos hidroalcoólicos de *Medigo sativa* Linnaeus (1753) e *Pennisetum purpureum* Schumacher (1827) sobre o desenvolvimento ponderal e fertilidade de ratas e desenvolvimnto da progênie**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DALLEGRAVE, E. **Toxicidade reprodutiva do herbicida Glifosato-Roundup® em ratos Wistar**. Porto Alegre: UFRGS, 2003. 225p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DEMETEROVÁ, M. An evaluation of the value of two leaves (Mango tree *Mangifera indica* L. And black mulberry *Morus nigra* L.) for rabbits. **Folia veterinária**. Vol. 42, n °1, 1998.

DESPAIGNE, D.A.N. Moduladores selectivos del receptor estrogénico. Su utilidad en la mujer posmenopáusica. **Rev Cubana Endocrinol**, 2001; 12 (2):124-7.

DUNCAN AM, MERZ BE, XU X, ET AL. Soy isoflavones exert modest hormonal effects in premenopausal women. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84 (1): 192-7

ELISABETSKY,E. Etnofarmacologia. **Cienc. Cult**; July/Sept.2003, vol.55,p.35-36.

ELISABETSKY, E. Traditional medicines and the new paradigm of psycotropic drug action. In: **Ethnomedicine and drug deveopment, Advances Phytomedicine**, vol

1,2002.

EMBRAFARMA. **Morus nigra**, 2006. Disponível em: <http://www.embrafarma.com.br>. Acesso em: 22 de Novembro,2006.

FITOTERAPIA pode ser opção para quem teme reposição hormonal clássica. **Folha de São Paulo**, Abril, 2001.

FRANCO, L. C. L. Fitoterapia em ginecologia: quando ela é melhor que o remédio. **Notícias Academia Sul-Americana de Medicina Integrada**. 1º semestre. Fevereiro, 2005.

FRATANE, Fernando. **Apostila de Plantas Mediciniais** - Niterói – RJ.

GINSBURG, J, PRELEVIC GM. Lack of significant hormonal effects and controlled trials of phytoestrogens. **Lancet** 2000;355:163-164.

GIANNINI, S.D. **Lipoproteínas como fatores de risco em mulheres**. Rev. Soc. Cardiol. Estado São Paulo. V.6 Disponível em: www.socesp.org.br/revistas/v6n6/htm. Acessado em: 15 de fev.2001.

GLAZIER, G.M., MB, BCh; MARJORIE A. BOWMAN, MD, MPA. A review of the evidence for the use of phytoestrogens as a replacement for tradicional estrogen replacement therapy. **Arch Intern Med**. 2001; 161: 1161-1172.

GOPUMADHAVAN S., VENKATARANGANNA M. V., MOHAMED RAFIQ. Evaluation of the estrogenic effect of Menosan using the rat models of uterotrophic assay. **Medicine Update**. 2005;13 (1); 37-41.

GULUBOVA R, BOIADEZHIEV Ts. Morphological changes in the endocrine pancreas of the rabbit after the administration of Morus alba extract. **Eksp Med Morfol**, 1975; 14(3): 166-71.

GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HAN, K.K.; SOARES, J.M.J; HAIDAR, M.A; *et al*. Efeitos dos fitoestrogênicos sobre alguns parâmetros clínicos e laboratoriais no climatério. **RBGO**, 24 (8), 2002: 547-552.

HARVEY,A.L. Natural products for high- throughput screening. In: **Ethnomedicine and drug development, Advances Phytomedicine**, vol 1, 2002.

HUGHES, C.L. Dietary Phytoestrogens. In: CHAPIN, R.E; STEVENS, J. T; HUGHES, C.L; WILLIAM, R.K; HESS, R.A. & DASTON, G. Symposium overview: endocrine modulation of reproduction. **Fundamental and Applied Toxicology**. Baltimore: Society of Toxicology, v. 29, p.1-17, 1996.

HOSSEINZADEH, H; A. SADEGUI. Antihyperglycemic effects of Morus nigra and

Morus Alba in mice. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**; 9(2): 63-65, 1999.

JANECZKO, A; SKOCZOWSKI, A. Mammalian sex hormones in plants. **Folia Histochemica Et Cytobiologica**, 43 (2), 2005: 71-79.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 7 ed. São Paulo: Nacional, 1985. 777p.

JUN KANNO; LESLEY ONYON; *et al.* The OECD Program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: Phase 1. **Environmental Health Perspectives**; 109(8), 2001.

KNIGHT, D.C; EDEN J.A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. **Obstet Gynecol** 1996; 87: 897-904.

KO H.H., YU S.M., KO F.N. Bioactive constituents of *Morus australis* and *Broussonetia papyrifera*. **J. Nat Prod.** 60 (10): 1008-11, 1997.

KO H.H., *et al.* Chemistry and biological activities of constituents of *Morus australis*. **Biochim Biophys Acta.** 1428 (2-3): 293-9, 1999.

KONDO H, NAKAJIMA N, YAMAMOTO N, *et al.* BE-14384 substances, new specific estrogen-receptor binding inhibitors. Production, isolation, structure determination and biological properties. **J Antibiot (Tokio)** 1990; 43: 1533-42.

LAPPONI, J. C. **Estatística usando o Excel**. São Paulo: Laponi treinamento, 1995. 289p.

LISSIN, LW, COOKE JP. Phytoestrogens and cardiovascular health. **J Am Coll Cardiol** 2000, 35:1403-10.

LIU J, BURDETTE JE, *et al.* Evaluation of estrogenic activity of plant extract for the potential treatment of menopausal symptoms. **J Agric Food Chem**, 2001; 49 (5): 2472-9.

LORENZI, HARRI. SOUZA, HERMES MOREIRA, *et al.* **Árvores exóticas do Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas**. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2003.

MARCONDES, F. K; BIANCHI, F.J. and TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz. J. Biol.**, 62 (4A): 609-614, 2002.

MARLES, R; FARNSWOTH, NR. **Antidiabetic plants and their active constituents**. *Phytomedicine*; 2 (2), 137-189.]

MARTÍN, J.D., RODRIGO, G.L., *et al.* Alcoholic beverages obtained from black mulberry. **Food Technol Biotechnol.** 41 (2) 173-176, 2003..

MIGUEL, M. D., MIGUEL, G. O. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999.

MINAYO, Maria Cecília de Souza. Saúde-doença: uma concepção popular da etiologia. **Cad. Saúde Pública.**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 4, 1988.

MORELLI V., NAQUIN, C. Alternative therapies for traditional diseases states: menopause. **American Family Physician**. 66(1) 129-134, 2002

NADERI, G. A., *et al.* Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. **Phytother Res**, 2004. . 18 (5), 365-369.

NAHÁS, E. A. P., NETO, J. N., *et al.* Efeitos da isoflavona sobre os sintomas climatéricos e o perfil lipídico na mulher em menopausa. **RBGO**. 25(5), 2003.

NEVES, B.A. – **Apostila de Ervas Medicinais: Manual de Doenças e Tratamentos** - Rio de Janeiro.

NOELI, F.R. Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia Guarani através de informações históricas. **I Simpósio de Etnobiologia e Etnoecologia Universidade Estadual de Feira de Santana**, Bahia. 1996.

NOMURA T., FUKAI T., HANO Y., *et al.* Chemistry and anti-tumor promoting activity of *Morus* flavonoids. **Prog Clin Biol Res**. 280:267-81, 1988.

PARIS, RR; MOYSE, M. **Précis de Matière Médicale. Tome II**. Paris: Masson, 1967, pp. 107-8.

PETLEVSKI R, HADZIJA M, *et al.* Effects of ‘antidiabetis’ herbal preparation on serum glucose and fructosamine in NOD mice. **J. Ethnopharmacol**; 75 (2-3):181-4, 2001.

POLKOVSKI K, MAZUZEK AP. Biological proprieties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. **Acta Pol Pharm** 2000; 57 (2): 135-55.

POTTER SM, BAUM JA, TENG H, *et al.* Soy protein and isoflavones their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. **Am J Clin Nutr** 1998: 68 (suppl): 1375-79.

QUER, P. F. **Plantas medicinales: el discórides renovado**. 6. ed. Barcelona: Editorial Labor, 1980. 1023p.

SANTOS, *et al.* Análise do mecanismo de ação antinociceptiva do composto tipo diels-alder *kuwanon G* isolado de plantas da família *Moraceae*. **XIV Anais do Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 1996.

SCHMIDT, C., LOPES, M. D., *et al.* Perfil lipoprotéico de cadelas submetidas à ovariectomia com e sem reposição estrogênica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.4, p.449-456, 2004.

SETCHELL KDR. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology and implications for human health of soy isoflavones. **Am J Clin Nutr** 1998; 69 (suppl): 1333-46.

SILVA, Penildon. **Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SIMONS RG, GRINWICH DL (1989). Immunoreactive detection of four mammalian steroids in plants. **Can J Bot** 67: 288-296.

SONAGLIO, D. **Padronização do extrato hidroalcoólico das sumidades floridas de *Achyroclines satureoides* (LAM) D.C Compositae (Marcela)**. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 1987. 163p. Dissertação (Mestrado).

SOUZA, L.E.R; POPIM, E.M, et al. Avaliação dos efeitos terapêuticos dos extratos de folhas de *Morus nigra L.* no tratamento de diabetes induzida em ratos. **VIII Seminário de pesquisa – PROPPE**, 2004.

SOUZA M.M, BITTAR M., CECHINEL-FILHO V, *et al.* Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark. **Z. Naturforsch [c]**: 55 (3-4): 256-60, 2000.

SPEROFF, L., ROWAN, J; SYMONS, J. *et al.* The comparative effect on bone density, endometrium, and lipids of continuous hormones as replacement therapy. **J. Am. Assoc.**, v.6, p. 1397-1403, 1996.

SULLIVAN, J.M. Estrogen replacement therapy. **Am. J. Med.**, v.101, p.56S-60S, 1996.

THAM DM, GARDENER CD, HUSKELL WL. Potencial health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical epidemiological, and mechanistic evidence. **J Clin Endocrinol Metab** 1998; 83 (7) 2223-35.

TOLEDO, A.C.O, HIRATA, L.L. *et al.* **Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica**. Revista Lecta, Bragança Paulista, 21 (1); 7-13, 2003.

VAN HELLEMONT, J. **Compendium de Phytotherapie**. Bruxelles: Association Pharmaceutique Belge, 1986, pp. 257-8.

VIGETA, S. M. G. A experiência da perimenopausa e pós-menopausa com mulheres que fazem uso ou não da terapia de reposição hormonal. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 20(6):1682-1689, 2004.

VILLAR, L; PALACÍN, JM; et al. **Plantas Medicinales del Pirineo Aragonés y demás tierras oscenses**. 2ª. Huesca: Diputación Provincial, 1992, p. 157.

VINCENT A, FITZPATRICK LA. Soy isoflavones: are they useful in menopause? **Mayo Clin Proc** 2000; 75: 1174-84.

WANNAMACHER, L. F.D. FUCHS. Conduta terapêutica embasada em evidências.

Rev Ass Med Brasil 2000; 46 (3):237-41.

WANNAMACHER, L., LUBIANCA, J.N. Terapia de reposição hormonal na menopausa: evidências atuais. **Boletim Sociedade Brasileira de Vigilância de Medicamentos**. 1(6),1-6, 2004.

WOLFE, B.M; HUFF, M.W. Effects of continuous low-dosage hormonal replacement therapy on lipoprotein metabolism in postmenopausal women. **Metabolism**, V.44,p.410-417, 1995.

YAMATAKE Y, SHIBATA M., NAGAI M. Pharmacological studies on root bark of mulberry tree (*Morus alba* L.).**Jpn J Pharmacol**. 26 (4): 461-9, 1976.

YEUNG J. M; S.C. SHIRLEY; W.C. KUNG ANNIE. High dietary intake is associated with higher bone mineral density in posmenopausal women. **J Clin Endocrinol Metabol**. 2001, 86, 5217-5221.

YIN DK, BARACAT EC, HAN KK, *et al*. Efeitos da isoflavona na síndrome do climatério. **Revista Brasileira de Medicina-Caderno de Ginecologia e Obstetrícia** 2000; 57: 21-3.

ZAR, J.H. **Bioestatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 123 p.