

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO OESTE**

ELISANA LIMA RODRIGUES

**EFEITOS DOS EXTRATOS DE FOLHA DE AMOREIRA (*Morus nigra* L.) EM
CAMUNDONGOS EM USO DE DIETA HIPERLIPÍDICA**

Campo Grande/2020

ELISANA LIMA RODRIGUES

**EFEITOS DOS EXTRATOS DE FOLHA DE AMOREIRA (*Morus nigra* L.) EM
CAMUNDONGOS EM USO DE DIETA HIPERLIPÍDICA**

Defesa apresentada como requisito para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-
graduação em Saúde e Desenvolvimento
na Região Centro-Oeste da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karine de Cássia
Freitas Gielow

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia
Avellaneda Guimarães

Campo Grande/2020

ELISANA LIMA RODRIGUES

**EFEITOS DOS EXTRATOS DE FOLHA DE AMOREIRA (*Morus nigra* L.) EM
CAMUNDONGOS EM USO DE DIETA HIPERLIPÍDICA**

Defesa apresentada como requisito para
obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-
graduação em Saúde e Desenvolvimento
na Região Centro-Oeste da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul

A banca examinadora, após a avaliação do trabalho, atribuiu ao candidato o conceito

_____.

Campo Grande, 21 de fevereiro de 2020

BANCA EXAMINADORA

CONCEITO

Prof^a. Dr^a. Rita de Cássia Avellaneda Guimarães - FACFAN/UFMS (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Danielle Bogo - UFMS (Membro)

Prof^a. Dr^a. Ângela Alves Nunes – UCDB (Membro)

Prof. Dr. Joaquim Corsino – UFMS (Suplente)

Dedico este trabalho a minha filha Helena,
a maior bênção da minha vida e a razão
pela qual quero ir mais longe.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida e por ter me proporcionado chegar até aqui.

À minha família, em especial ao meu pai Osmar, minha mãe Sivanilda e meu irmão Andrei, por todo apoio, paciência e compreensão das ausências.

Ao companheirismo e incentivo do meu esposo Gilson, que não me deixou desistir perante as dificuldades. Gratidão infinita meu querido, esta é uma das muitas conquistas ao seu lado.

À minha sogra Nadir por cuidar da minha pequena com muito amor e carinho, para que eu pudesse redigir esta dissertação.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Karine por acreditar em mim e estimular a realizar o mestrado. Pelo exemplo de dedicação, competência, responsabilidade e seriedade pessoal e profissional.

À Prof^a Dr^a Rita, pela coorientação, disponibilidade em partilhar experiências e por todo ensinamento.

Ao Prof Dr Joaquim, pela atenção, ensinamentos e ajuda no meu trabalho.

Agradeço especialmente à minha amiga Laleska, que compartilhou comigo cada passo deste projeto e cuidou dos animais com muito carinho. Não existem palavras suficientes que me permitam agradecer com o devido merecimento, sua ajuda e apoio foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

À Lidiani, Aline, Gabriela Torres, Gabriela Marcelino, Priscila, Amanda e Carla pela valiosa colaboração em diversas etapas de execução do projeto.

Agradeço aos animais, que cederam suas vidas em prol do desenvolvimento da pesquisa.

Ao senhor Deoclides Batistoti por apoiar esta pesquisa fornecendo as folhas de amoreira utilizadas nesta pesquisa.

Aos funcionários do Biotério Central, da Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, professores e técnicos da UFMS que contribuíram com este trabalho direta ou indiretamente.

À agência financiadora CAPES, pela concessão de auxílio financeiro para o desenvolvimento desta pesquisa.

E a todos que alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, a minha gratidão!!

RESUMO

A obesidade é considerada como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo e um importante fator de risco para doenças crônicas não transmissíveis. Muitas plantas medicinais são amplamente utilizadas de modo empírico pela população brasileira para cura e/ou prevenção de algumas doenças. Dentre as espécies de plantas utilizadas para fins medicinais encontra-se a amoreira do gênero *Morus*, que pode oferecer efeito antioxidante, anti-inflamatório, hipotensivo, antidiabético, entre outros. Assim o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do extrato etanólico e aquoso da folha da *Morus nigra* L. em camundongos em uso de dieta hiperlipídica. Primeiramente foi realizado o teste de toxicidade aguda em 15 camundongos *Swiss* fêmeas, divididos em 3 grupos: controle tratado com salina, grupo tratado com extrato etanólico e grupo tratado com extrato aquoso da *Morus nigra* L. na dose 2000 mg/kg, via gavagem. Foi analisado a presença de sinais de toxicidade nas primeiras horas após o tratamento e periodicamente por 14 dias. Para o experimento, utilizou-se 72 camundongos *Swiss* machos os quais foram divididos em 6 grupos experimentais de acordo com o peso corporal. Os animais foram tratados com dieta e água *ad libitum* recebendo os respectivos tratamentos via gavagem, por um período de 12 semanas: grupo dieta normal e salina (DNS), dieta hiperlipídica e salina (DHS), dieta hiperlipídica e extrato etanólico de folhas da amoreira na concentração de 200 mg/kg (EAA200), dieta hiperlipídica, extrato etanólico de folhas da amoreira na concentração de 400 mg/kg (EAA400), dieta hiperlipídica e extrato aquoso de folhas da amoreira na concentração de 200 mg/kg (EAA200) e dieta hiperlipídica e extrato aquoso de folhas da amoreira na concentração de 400 mg/kg (EAA400). Foram avaliados os seguintes parâmetros: peso corporal, ingestão alimentar, perfil lipídico e glicêmico, adiposidade visceral (peso dos coxins adiposos, fígado e pâncreas) e dosagem de citocinas (IL-6, TNF- α , MCP-1 e IL-10). Os resultados mostram que não houve sinais de toxicidade ou mortalidade. Os animais do grupo EAA200 apresentaram maior ganho de peso ($p \leq 0,001$) em relação ao grupo DNS e DHS. Além disto, este grupo reportou maior ingestão alimentar total que os demais grupos em dieta hipercalórica. Nas análises bioquímicas foi observado níveis elevados de triglicerídeos e VLDL nos grupos EEA400 e DNS. No grupo EAA400 verificou-se níveis elevados de HDL, o que sugere possível proteção cardiovascular. Não se observou diferença significativa entre os grupos de animais para o colesterol total, LDL, índice aterogênico e glicemia de jejum. No entanto os grupos que receberam EEA200 e EAA400 conseguiram manter comportamento glicêmico semelhante ao grupo DNS, mesmo em dieta hiperlipídica. Acrescenta-se que os extratos não reduziram a adiposidade visceral, havendo maior deposição de gordura hepática nos grupos EEA400 e EAA200. Na dosagem de interleucinas IL-6, o grupo DHS apresentou a maior média de concentração. Para as citocinas TNF- α e IL-10 não houve diferença entre os grupos. Já para o MCP-1 os grupos DHS, EAA200 e EAA400 obtiveram concentrações estatisticamente significativas em comparação ao grupo DNS. Conclui-se que no modelo estudado os extratos etanólico e aquoso da amoreira não foram eficazes no combate à obesidade e suas alterações metabólicas.

Palavras-chave: Obesidade, plantas medicinais, dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

Obesity is considered as one of the biggest public health problems in the world and an important risk factor for chronic non-communicable diseases. Many medicinal plants are widely used empirically by the Brazilian population to cure and / or prevent some diseases. Among the species of plants used for medicinal purposes is the mulberry of the genus *Morus*, which can offer antioxidant, anti-inflammatory, hypotensive, anti-diabetic effects, among others. Thus, the objective of this study is to evaluate the effects of the ethanolic and aqueous extract of the leaf of *Morus nigra* L. in mice using a high-fat diet. Firstly, the acute toxicity test was performed on 15 female Swiss mice, divided into 3 groups: control treated with saline, group treated with ethanolic extract and group treated with aqueous extract of *Morus nigra* L. at 2000 mg / kg, via gavage. The presence of signs of toxicity was analyzed in the first hours after treatment and periodically for 14 days. For the experiment, 72 male Swiss mice were used, which were divided into 6 experimental groups according to body weight. The animals were treated with diet and water ad libitum receiving the respective treatments via gavage, for a period of 12 weeks: normal diet and saline group (DNS), hyperlipidic and saline diet (DHS), hyperlipidic diet and ethanolic extract of mulberry leaves at a concentration of 200 mg / kg (EEA200), a high fat diet, ethanol extract of mulberry leaves at a concentration of 400 mg / kg (EEA400), a high fat diet and aqueous extract of mulberry leaves at a concentration of 200 mg / kg (EAA200) and hyperlipidic diet and aqueous extract of mulberry leaves at a concentration of 400 mg / kg (EAA400). The following parameters were evaluated: body weight, food intake, lipid and glycemic profile, visceral adiposity (weight of fat pads, liver and pancreas) and cytokine levels (IL-6, TNF- α , MCP-1 and IL-10). The results show that there were no signs of toxicity or mortality. The animals in the EAA200 group showed greater weight gain ($p \leq 0.001$) compared to the DNS and DHS group. In addition, this group reported higher total food intake than the other groups on a high-calorie diet. In biochemical analyzes, high levels of triglycerides and VLDL were observed in the EEA400 and DNS groups. In the EAA400 group, high levels of HDL were found, which suggests possible cardiovascular protection. There was no significant difference between groups of animals for total cholesterol, LDL, atherogenic index and fasting glucose. However, the groups that received EEA200 and EAA400 managed to maintain glycemic behavior similar to the DNS group, even on a high-fat diet. It is added that the extracts did not reduce visceral adiposity, with greater deposition of liver fat in the EEA400 and EAA200 groups. In the dosage of IL-6 interleukins, the DHS group had the highest concentration average. For TNF- α and IL-10 cytokines there was no difference between groups. For the MCP-1, the DHS, EAA200 and EAA400 groups obtained statistically significant concentrations compared to the DNS group. It is concluded that in the model studied the ethanolic and aqueous extracts of the mulberry were not effective in combating obesity and its metabolic alterations.

Key words: obesity, medicinal plants, high-fat diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Marcadores inflamatórios secretados pelo tecido adiposo.....	19
Figura 2 - Planta amoreira (<i>Morus nigra</i> L.).....	24
Figura 3 - Delineamento experimental.....	31
Figura 4 - Ganho de peso corporal, consumo alimentar e peso dos órgãos dos animais do teste de toxicidade aguda.....	37
Figura 5 - Ganho de peso dos diferentes grupos experimentais nos 1º, 2º e 3º mês.....	41
Figura 6 - Ingestão alimentar dos diferentes grupos experimentais nos 1º, 2º e 3º mês.....	43
Figura 7 - Teste de tolerância oral a glicose e a área da curva glicêmica dos diferentes grupos experimentais.....	48
Figura 8 - Teste de sensibilidade à insulina e a área da curva glicêmica dos diferentes grupos experimentais.....	50
Figura 9 - Dosagem das citocinas IL-6, TNF- α , MCP-1 e IL- 10 no soro dos animais dos diferentes grupos experimentais.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação do Índice de Massa Corporal para adultos.....	16
Tabela 2 - Valores de classificação da relação entre Cintura-Quadril como indicador antropométrico.....	17
Tabela 3 - Composição das dietas experimentais.....	30
Tabela 4 - Peso inicial e final, ganho de peso, ingestão alimentar de animais controles e tratados com extrato etanólico e aquoso das folhas de amoreira.....	39
Tabela 5 - Perfil lipídico e glicemia de jejum de animais controles e tratados com extrato etanólico e aquoso das folhas de amoreira.....	45
Tabela 6 - Efeito dos extratos etanólico e aquoso das folhas de amoreira sobre os coxins adiposos, Índice de adiposidade, peso do fígado e pâncreas.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
$\mu\text{l/mL}$	Microlitro por mililitro
AG	Ácidos graxos
AIN-93M	<i>American Institute of Nutrition</i>
AMPK	Proteína quinase ativada
AUC	Área sob a curva
CC	Circunferência da Cintura
CEA	Coeficiente de eficácia alimentar
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CGPCC	Cálculo do coeficiente de ganho de peso por consumo calórico
cm	Centímetros
CQ	Circunferência do Quadril
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doença Cardiovascular
DHS	Dieta hiperlipídica salina
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DNS	Dieta normal salina
EAA	Extrato aquoso da folha da amora
EAA 200 mg/kg	Extrato aquoso da folha de amora - 200 mg/kg
EAA 400 mg/kg	Extrato aquoso da folha de amora - 400 mg/kg
EEA	Extrato etanólico da folha da amora
EEA 200 mg/kg	Extrato etanólico da folha da amora - 200 mg/kg
EEA 400 mg/kg	Extrato etanólico da folha de amora - 400 mg/kg
ELISA	<i>Elise enzyme linked</i>
g	Gramas
g/kg	Gramas por quilograma
GLUT4	Transportador de glicose tipo 4
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IC ₅₀	Concentração inibitória média
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IL-10	Interleucinas -10

IL-6	Interleucina - 6
IMC	Índice de massa corporal
IRS-1	Substrato 1 do receptor da insulina
Kcal	Quilocalorias
kg	Quilogramas
kg/m ²	Quilograma por metro quadrado
L	Litro
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LPCS	Laboratório de Pesquisas em Ciências da Saúde
MCHC	Concentração de hemoglobina corpuscular média
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
mg	Miligramas
mg/dL	Miligramas por decilitro
mg/kg	Miligramas por quilograma
MHC	Hemoglobina corpuscular média
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI-1	Inibidor do Ativador do Plasminogênio-1
PCR	Proteína C reativa
pg/mg	Picograma por miligramas
PPAR α	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma alfa
RCQ	Relação cintura quadril
RI	Resistência à insulina
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
U/mL	Unidade por mililitro
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
UFMS	Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
VCM	Volume corpuscular médio
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Obesidade: etiologia, definição e classificação	16
2.2 Epidemiologia da obesidade	17
2.3 Complicações associadas à obesidade	18
2.4 Plantas medicinais	22
2.5 Espécie <i>Morus</i> - amoreira.....	23
3 OBJETIVOS	26
3.1 Geral	26
3.2 Específicos	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1 Obtenção da matéria prima	27
4.2 Preparação do extrato etanólico.....	27
4.3 Preparação do extrato aquoso	27
4.4 Protocolo experimental.....	28
4.4.1 Parâmetros éticos	28
4.4.2 Teste de toxicidade aguda.....	28
4.4.3 Composição das dietas	29
4.4.4 Delineamento experimental.....	30
4.5 Métodos analíticos	32
4.5.1 Controle do peso corporal.....	32
4.5.2 Avaliação da ingestão alimentar, eficácia alimentar e ganho de peso	32
4.5.3 Avaliação da gordura corporal, peso do fígado e pâncreas.....	33
4.6 Análises séricas	33

4.6.1 Perfil glicêmico: glicemia de jejum, teste de tolerância oral à glicose e sensibilidade à insulina	33
4.6.2 Perfil lipídico: triglicerídeos, colesterol total e frações e índice aterogênico	34
4.6.3 Marcadores inflamatórios: TNF-alfa, IL-6, IL-10 e MCP-1.....	35
4.7 Análise estatística	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL- UFMS....	67
ANEXO B - TESTE HIPOCRÁTICO: TOXICIDADE DE DROGAS POR ANÁLISE COMPORTAMENTAL	69

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a obesidade tornou-se um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, uma vez que entre 1975 e 2016, a sua prevalência mundial praticamente triplicou. Em 2016, 39% dos adultos com idade ≥ 18 anos foram diagnosticados com excesso de peso e 13% com obesidade (WHO, 2017). No Brasil, a frequência de excesso de peso aparece em 52,9% dos brasileiros adultos com idade ≥ 25 anos. Assim como, em Campo Grande, capital do estado de Mato Grosso do Sul, mais da metade da população apresenta excesso de peso (58,5%) (BRASIL, 2019).

A obesidade é julgada complexa e multifatorial, resultando da interação de genes, ambiente, estilo de vida e fatores emocionais. Atualmente, colaboram para a epidemiologia da obesidade, a menor prática de atividade física associada ao consumo elevado de alimentos com alta densidade calórica, alta palatabilidade, baixo poder de saciedade e de fácil digestão e absorção, que contribuem para o desequilíbrio energético. Outro forte estímulo para obesidade trata-se da diminuição do número de refeições realizadas em casa com aumento compensatório da alimentação em redes de *fast food* (ABESO, 2016).

O acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, que caracteriza a obesidade, é um importante fator de risco para doenças crônicas não transmissíveis, como doença cardiovascular, hipertensão, câncer, dislipidemia, resistência à insulina, diabetes mellitus, complicações hepáticas, entre outras (WHO, 2000). Tais doenças estão relacionadas principalmente a proteínas pró-inflamatórias da obesidade, conhecidas como adipocinas, entre elas Interleucina-6 (IL-6), adiponectina, leptina, Inibidor do Ativador do Plasminogênio-1 (PAI-1) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) (BARBALHO *et al.*, 2015).

Sabe-se que muitas plantas medicinais são amplamente utilizadas de modo empírico pela população brasileira em diversas circunstâncias, seja para cura e/ou prevenção de alguma doença/sintoma. Dentre as espécies de plantas utilizadas para fins medicinais encontra-se a amoreira do gênero *Morus* (KUMAR; CHAUHAN, 2008).

Estudos apontam os benefícios que as espécies *Morus* podem oferecer como efeito antioxidante (VOLPATO *et al.*, 2011), anti-inflamatório, hepatoprotetor,

hipotensivo, antipirético, analgésico, diurético, expectorante e antidiabético (CHEN *et al.*, 1995; NOMURA, 1988), isto possivelmente deve-se ao seu conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides e antocianinas (RODRIGUES *et al.*; 2019).

Em particular a *Morus nigra* espécie popularmente conhecida como “amora miura” e de origem asiática, adaptou-se bem à região brasileira, sendo o chá das folhas (decocto) popularmente utilizado na região do Vale do São Francisco, Brasil, para o tratamento de diabetes, colesterol, problemas cardiovasculares, obesidade e gota (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Ainda, devido a característica antioxidante das folhas de *Morus nigra*, a administração do seu extrato hidroetanólico demonstrou inibição do crescimento de células cancerígenas e indicou proteção contra possível lesão hepática (TAG, 2015).

Embora tenham sido evidenciadas na literatura as possíveis propriedades benéficas da folha de amoreira, ainda não há estudos suficientes para esclarecer seu papel na prevenção e/ou tratamento de obesidade e transtornos metabólicos. Deste modo, esta pesquisa objetivou avaliar os efeitos dos extratos etanólico e aquoso da folha da *Morus nigra* L. em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Obesidade: etiologia, definição e classificação

A obesidade pode ser considerada uma doença crônica multifatorial, desencadeada pela interação de fatores genéticos e ambientais, que associado com consumo energético positivo favorece o acúmulo anormal e excessivo de gordura corporal (WHO, 2000). Estudos demonstraram que os efeitos etiológicos da genética sobre o acúmulo de tecido adiposo corporal correspondem a 25% e os fatores ambientais correspondem a 75% (PÉRUSSE *et al.*, 1999; SILVA; MURA, 2010; ALVARENGA *et al.*, 2011).

O aumento do consumo de alimentos com alta densidade calórica associado à menor prática de atividade física contribuem para o desequilíbrio energético, principal causa do sobrepeso e obesidade (ABESO, 2016). Por conseguinte, este desequilíbrio leva a hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos e assim aumenta os riscos do desenvolvimento de doenças associadas à obesidade (BRAY, 2004; CUPPARI, 2005; RUBIN, 2010).

Para o diagnóstico e classificação do sobrepeso e da obesidade em adultos é utilizado o índice de massa corporal (IMC), que é calculado a partir do peso do indivíduo em quilogramas dividido pela sua altura em metros ao quadrado (kg/m^2) (ABESO, 2016) (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação do Índice de Massa Corporal para adultos.

IMC (kg/m^2)	CLASSIFICAÇÃO	OBESIDADE GRAU/CLASSE	RISCO DE COMORBIDADES
< 18,5	Magro ou Baixo peso	0	Normal ou elevado
18,5 – 24,9	Normal ou Eutrófico	0	Normal
25,0 – 29,9	Sobrepeso ou pré-obeso	0	Pouco elevado
30,0 – 34,9	Obesidade	I	Elevado
35,0 – 39,9	Obesidade	II	Muito elevado
$\geq 40,0$	Obesidade grave	III	Muitíssimo elevado

Fonte: ABESO (2016)

Para estimar a prevalência de obesidade o IMC é um bom indicador, contudo, não está diretamente ligado com a gordura corporal, ou seja, não diferencia massa magra de massa gordurosa, bem como a distribuição de gordura corporal, que difere entre os indivíduos em razão do sexo, idade, nível de atividade física, entre outros aspectos (ABESO, 2016).

A medida da Circunferência da Cintura (CC) é um indicador antropométrico que está relacionado ao IMC para avaliar a distribuição de gordura corporal em adultos (OLIVEIRA *et al.*, 2010), e avalia o risco para doenças cardiovasculares. Para homens, o ponto de corte para risco é uma circunferência de cintura \geq a 94 cm, se >102 cm representa risco muito aumentado. Nas mulheres o ponto de corte da medida da circunferência da cintura é \geq a 80 cm e se >88 cm representa risco muito aumentado (WHO, 2008; CALIXTO-LIMA; GONZALEZ, 2013).

Além disso, outro indicador antropométrico para avaliar a distribuição de gordura corporal em adultos é a Razão Cintura-Quadril (RCQ), medida que reflete o acúmulo de gordura intra-abdominal, assim como a CC. O cálculo se dá por meio da divisão dos valores de (CC) e Circunferência do Quadril (CQ) (WHO, 2008; CALIXTO-LIMA; GONZALEZ, 2013). Os valores de classificação da RCQ estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de classificação da relação entre Cintura-Quadril como indicador antropométrico.

Gênero	Baixo	Moderado	Alto	Muito Alto
Masculino	<0,85	0,85 – 0,89	0,90 – 0,95	\geq 0,95
Feminino	<0,75	0,75 – 0,79	0,80 – 0,86	\geq 0,86

Fonte: Adaptada de Bray e Gray (1988).

2.2 Epidemiologia da obesidade

A prevalência mundial de obesidade tem aumentado constantemente ao longo dos anos. Dados da OMS indicam que mais de 1,9 bilhão de adultos maiores de 18 anos tinham excesso de peso em 2016, destes, mais de 650 milhões eram obesos, estes valores correspondem a cerca de 13% da população adulta mundial (11% dos homens e 15% das mulheres). Em relação às crianças menores de 5

anos, estimou-se neste mesmo ano que em torno de 41 milhões de crianças estavam acima do peso (WHO, 2017).

Nos Estados Unidos, entre os anos de 2015 e 2016, a prevalência de obesidade em indivíduos adultos (≥ 20 anos) era de 35,7%. Analisando essa prevalência entre os sexos, 36,5% das mulheres e 34,8% dos homens estavam obesos (HALES *et al.*, 2017). Já para as crianças americanas com faixa etária de 2 a 5 anos, a prevalência de excesso de peso foi de 13,7%, entre os anos 2015 e 2016 (SKINNER *et al.*, 2018).

No Brasil, de acordo com a Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico VIGITEL (2018), realizada pelo Ministério da Saúde em todas as capitais brasileiras e no Distrito Federal, a frequência de excesso de peso foi de 55,7% dos brasileiros adultos com idade ≥ 18 anos, indicando Cuiabá como a capital com a maior frequência (60,7%), e a menor em São Luís com 47,2% (BRASIL, 2019). Em relação às crianças de 5 a 9 anos de idade, a Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009, indicou uma prevalência de 32% de sobrepeso e 11,8% de obesidade (IBGE, 2010).

Em 2017, a VIGITEL apontava a capital Campo Grande (MS) com 59,8% da população apresentando excesso de peso, sendo uma das capitais com maior frequência do indicador excesso de peso entre as mulheres (51,9%) (BRASIL, 2018). Do mesmo modo, na pesquisa realizada em 2018, Campo Grande ainda aparece com mais da metade da população apresentando excesso de peso (58,5%), sendo 61,2% do sexo masculino e 56,1% do sexo feminino (BRASIL, 2019).

Para a obesidade no conjunto das capitais brasileiras, foi encontrada a frequência de 19,8% de adultos (≥ 18 anos) obesos, sendo pouco maior entre as mulheres (20,7%) do que entre os homens (18,7%). Em Campo Grande, os dados indicam 21,5% de adultos obesos, com prevalência semelhante entre os sexos masculino (21,4%) e feminino (21,5%) (BRASIL, 2019).

2.3 Complicações associadas à obesidade

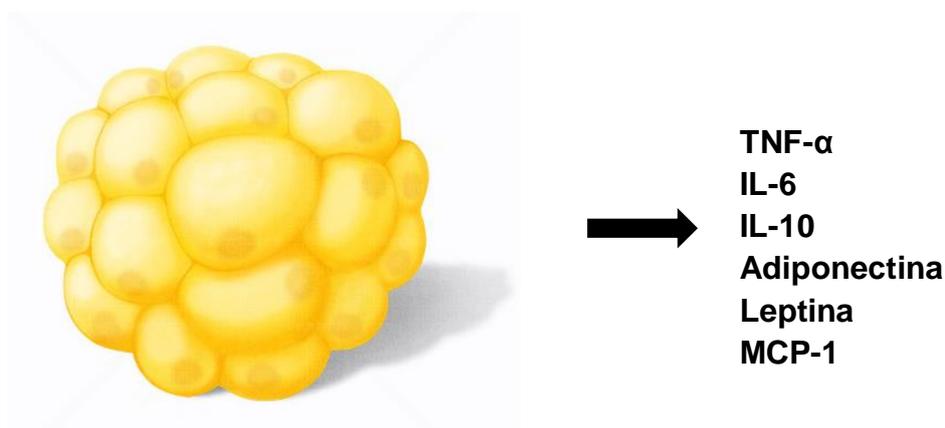
A obesidade é considerada um importante fator de risco para doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como por exemplo, doença cardiovascular, hipertensão,

dislipidemia, resistência à insulina, diabetes mellitus, complicações hepáticas e câncer (WHO, 2000).

Estas doenças geram um grande custo econômico a saúde pública no Brasil, além de serem responsáveis por um elevado número de mortes prematuras (MALTA *et al.*, 2014). Em 2016, as DCNT foram responsáveis por 74% do total de mortes. Entre as doenças as mais frequentes causas de óbito são: doenças cardiovasculares (28%), neoplasias (18%), doenças respiratórias (6%) e o diabetes (5%) (WHO, 2018).

O tecido adiposo é reconhecido como órgão endócrino (BERG, 2002; QUEIROZ, 2009) responsável por produzir diversas adipocinas (Figura 1), dentre as quais podemos citar, as interleucinas, adiponectina, leptina e TNF- α (BARBALHO *et al.*, 2015). As adipocinas são essenciais para a homeostase energética, na sensibilidade à insulina, para a resposta imunológica e também nas doenças cardiovasculares (DCV), portanto o desequilíbrio na liberação de adipocinas está diretamente relacionado aos processos inflamatórios (SANTOS; TORRENT, 2010; BARBALHO *et al.*, 2015).

Figura 1 - Marcadores inflamatórios secretados pelo tecido adiposo.



Fonte: adaptado de Trayhurn e Wood (2004) *apud* Prado *et al.* (2009).

Nota: TNF- α -fator de necrose tumoral- α ; IL- interleucina; MCP-1-Proteína quimiotática de Monócitos-1

A obesidade leva ao aumento da expressão de adipocinas pró-inflamatórias e a diminuição de adipocinas anti-inflamatórias, levando ao desenvolvimento de um

estado inflamatório crônico de baixo grau. Este desequilíbrio de adipocinas é um elemento chave na promoção de DCV (NAKAMURA *et al.*, 2014).

As DCV, principalmente as doenças cardíacas e acidente vascular encefálico são doenças que se desenvolvem como consequência do sobrepeso e obesidade e que prejudicam o coração e os vasos sanguíneos. São provocadas principalmente pela deposição de placas de gordura e cálcio no interior das artérias, dificultando ou impedindo a circulação sanguínea nos órgãos (BOURBON *et al.*, 2016).

O TNF- α apresenta papéis na fisiopatologia da DCV. Em condições de insuficiência cardíaca ou lesões agudas e crônicas os níveis de TNF- α mostram-se aumentados. Kleinbongard e colaboradores (2010) demonstraram em estudo experimental que a neutralização do TNF- α ou o bloqueio de seu receptor, diminuem o dano miocárdico em modelos de insuficiência cardíaca, isquemia e reperfusão.

A Interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória que promove a produção da proteína C reativa (PCR) nos hepatócitos, colaborando para o aumento da secreção da lipoproteína VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) e hipertrigliceridemia, como também, promove a redução da ação da lipase lipoproteica, aumenta a captação de lipídios pelos macrófagos e atua diretamente sobre a sensibilidade insulínica, inibindo o receptor de insulina dependente de autofosforilação e assim, altera sua sinalização nos hepatócitos (GUIMARÃES *et al.*, 2007; SANTOS; TORRENT, 2010).

A adiponectina tem aplicabilidade na regulação do metabolismo de lipídios e da glicose, promovendo melhora na sensibilidade à insulina mediante ao aumento da proteína quinase ativada (AMPK) e receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR α), apresentando ação antiaterogênica, antifibrogênica induzindo a oxidação de gorduras e diminuindo os triglicerídeos, além de ação anti-inflamatória, reduzindo a produção de TNF- α e IL-6 com consequente aumento da síntese de IL-10 (SHEHZAD *et al.*, 2012).

A IL-10 é responsável pela normalização do sistema imune mediante *feedback* negativo, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Baixos níveis desta citocina em indivíduos obesos pode levar a resistência à insulina, aterosclerose e isquemia coronária aguda (VOLP *et al.*, 2008; ARSLAN *et al.*, 2010).

A leptina é essencialmente secretada pelos adipócitos de maneira proporcional à massa de células adiposas, atua no cérebro, principalmente nas células do hipotálamo para regular o apetite, aumentar o gasto energético e também

exerce influência no metabolismo da glicose e lipídios (FRIEDMAN; HALAAS, 1998), sendo assim, em indivíduos obesos os níveis de leptina estão aumentados pelo aumento da secreção e a diminuição de seus receptores específicos, comprometendo sua função benéfica por não conseguir atuar da maneira correta e assim causa prejuízos à saúde do indivíduo (ROMERO; ZANESCO, 2006; PRADO *et al.*, 2009; MAURY; BRICHARD, 2010).

Além disso, a Proteína Quimiotática para Monócitos, também conhecida como Ligante 2 de Quimiocina (MCP-1/CCL-2) que igualmente é secretada pelo tecido adiposo e em conjunto com seus receptores, possuem uma função importante no desenvolvimento das respostas inflamatórias, sendo fundamentais para transportar as células imunológicas para os locais de inflamação, em obesos os níveis de MCP-1 estão elevados (BRUUN *et al.*, 2005) e desta forma está envolvida na resistência à insulina, na diminuição da captação de glicose, nas lesões ateroscleróticas e conseqüentemente na doença arterial coronariana (WEISBERG *et al.*, 2006; LEITE; ROCHA; BRANDÃO-NETO, 2009).

A resistência à insulina (RI) e o diabetes tipo 2 (DM2) também estão diretamente relacionados à inflamação crônica no tecido adiposo que se caracteriza pelo estímulo de uma série de vias de sinalização inflamatória, uma formação de citocinas anormal, aumento de proteínas de fase aguda e de diversos outros mediadores (WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

A RI está diretamente relacionada com o excesso de peso e alterações metabólicas como o diabetes, hipertensão e dislipidemia, que quando em conjunto originam a síndrome metabólica (FARIA *et al.*, 2014). É caracterizada pela ação da insulina prejudicada e ocorre principalmente devido o comprometimento da captação de glicose no músculo e o aumento da produção de glicose pelo fígado, com conseqüente hiperglicemia, tanto em jejum como em estado pós-prandial (SAMUEL; SHULMAN, 2012; CASTRO *et al.*, 2014).

O DM2 está ligado a fatores genéticos e ambientais, e, deste último, os mais relevantes são sedentarismo e dietas ricas em gorduras, desenvolve-se por defeitos na ação e secreção da insulina e na regulação da produção hepática de glicose. A evolução clínica do DM2 passa por estágios intermediários denominados de glicemia de jejum alterada e tolerância à glicose diminuída. Tais estágios são decorrentes de uma combinação de resistência à ação insulínica e disfunção de célula beta (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2016).

As alterações metabólicas e fisiológicas que se manifestam no DM2 envolvem alteração no metabolismo dos carboidratos resultante da diminuição da resposta insulínica, principalmente no tecido muscular e adiposo, levando à hiperglicemia e a alterações no metabolismo dos lipídeos, acarretando as dislipidemias. Ainda, há modificações no padrão de resposta imune, com consequente instalação de um processo inflamatório que resultará na exacerbação de alterações bioquímicas e aumento da produção de mediadores inflamatórios (BARBALHO *et al.*, 2015).

As alterações na secreção e ação da insulina na obesidade também são agentes da dislipidemia, que se caracteriza pelo aumento de lipoproteínas ricas em triglicerídeos, redução de lipoproteínas de alta densidade (HDL) e elevação da concentração das partículas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) pequenas e densas. Além disso, ocorre a superprodução de VLDL no fígado pelo aumento da oferta de glicose e ácido graxos livres, e por conseguinte acúmulo de VLDL na circulação sanguínea, devido síntese e vida média aumentada (PATRÍCIO, 2010).

A dislipidemia associada à obesidade tem como principal fator a liberação descontrolada de ácidos graxos no tecido adiposo por meio da lipólise, levando ao aumento do fornecimento de ácidos graxos ao fígado e a síntese de VLDL. Níveis elevados de ácidos graxos diminuem a atividade da lipoproteína lipase no tecido adiposo e no músculo esquelético, o aumento de VLDL no fígado pode inibir a lipólise de quilomícrons, propiciando a hipertrigliceridemia (CLEMENTE-POSTIGO *et al.*, 2011; KLOP *et al.*, 2012).

2.4 Plantas medicinais

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define planta medicinal como aquela capaz de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade, normalmente utilizada na forma de chá ou infusões (BRASIL, 2020). Desde séculos atrás são utilizadas para o tratamento de diversas doenças (PASCOALE, 1984), devido ao menor custo e maior acesso pela população, especialmente em comparação aos medicamentos modernos, desta forma as plantas medicinais tornaram-se uma parte importante do sistema de cuidados de saúde primários (THAIPITAKWONG; NUMHOM; ARAMWIT, 2018).

As plantas medicinais inicialmente eram utilizadas normalmente na forma de pó seco, gomas, extratos ou formulações com produtos vegetais usados de maneira associada (KUMAR *et al.*, 2011). Com técnicas científicas avançadas, produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, passaram a ter importância para o desenvolvimento de drogas terapêuticas (CALIXTO, 1997). Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida mundialmente, é reconhecido que grande parte da população dos países em desenvolvimento continua empregando as plantas como cuidado primário ou complementar ao uso de medicamentos (BRASIL, 2016).

Há relatos de tratamento terapêutico derivado de plantas em diferentes populações, principalmente as asiáticas, com aplicações no tratamento e prevenção de diferentes desordens, como processos inflamatórios, doenças intestinais, afecções cutâneas e até mesmo câncer (HOSSEINZADEH *et al.*, 2015). O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tendo um grande potencial para o desenvolvimento de pesquisas para terapêuticas apropriadas (BRASIL, 2016).

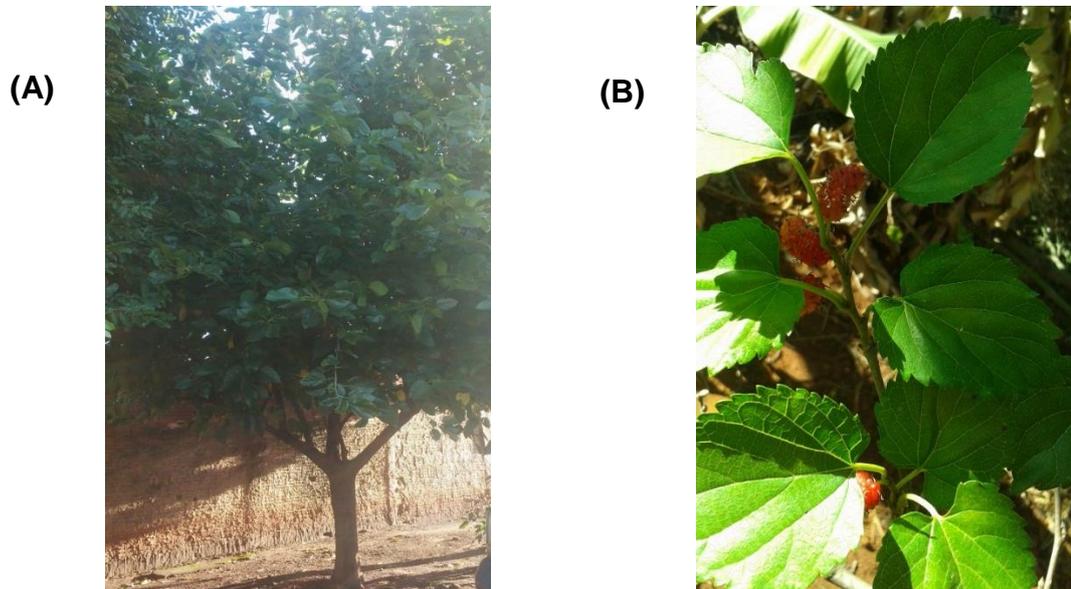
Na literatura ainda são escassos os estudos que utilizam partes das plantas medicinais e desta forma permanecem sendo utilizadas com base principalmente na cultura popular. Neste sentido, devido à ampla variedade de espécies e efeitos relacionados ao seu uso, é de extrema importância pesquisas que busquem identificar os mecanismos envolvidos nestes processos, principalmente relacionados às DCNT como a obesidade e diabetes, visto que muitas plantas apresentam efeitos antidiabéticos (HOSSEINZADEH *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2017), entre outros que atuam no combate destas doenças.

2.5 Espécie *Morus* - amoreira

A amoreira (Figura 2) pertence ao gênero *Morus* da família Moraceae, tal espécie é um monóico ou dióico plantar de pequeno a médio porte, amplamente distribuída na Índia, China, Japão, Norte da África, Arábia, Sul da Europa, dentre outras regiões (KUMAR; CHAUHAN, 2008). Existem 24 espécies de *Morus* e pelo menos 100 variedades de subespécies conhecidas que se adaptam em condições climáticas, topográficas e de solo variadas. São três as espécies mais comuns:

Morus alba (amora branca), *Morus nigra* (amora preta) e *Morus rubra* (amora vermelha) (ERCISLI; ORHAN, 2007; IMRAN *et al.*, 2010).

Figura 2 - Planta amoreira (*Morus nigra* L.).



Fonte: a autora

Nota: **(A)** *Morus nigra* L. **(B)** folhas e frutos.

A espécie *Morus* é uma importante fonte de compostos fenólicos, incluindo os flavonoides e antocianinas que são de grande interesse biológico, farmacológico e estrutural por suas propriedades antioxidantes (KUMAR; CHAUHAN, 2008). Em virtude destas propriedades antioxidantes tradicionalmente esta espécie é utilizada para a prevenção de doenças hepáticas, renais, danos articulares e antienvhecimento (MENA *et al.*, 2016).

A amoreira também é utilizada no tratamento do DM2 devido aos seus efeitos hipoglicemiantes (SÁNCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2017). Nas folhas de algumas espécies de amora à presença da 1-deoxinojirimicina, conhecida por ser um dos mais potentes inibidores da α -glicosidase (KIM *et al.*, 2003). Além disso, pela presença de flavonóides, especialmente as isoflavonas, o chá das folhas de amoreira é utilizado para aliviar sintomas do climatério e os sintomas de cefaleia e irritação que ocorrem no período pré-menstrual (GUIZZO *et al.*, 2015).

Em relação à composição físico-química valores mais elevados de lipídios são encontrados nas folhas de amoreira que nos frutos, sendo que as folhas de *Morus alba* apresentou 6,57%, *Morus nigra* 5,13% e a *Morus rubra* 4,24% (IQBAL *et al.*,

2012). O perfil desses Ácidos Graxos (AG) apresenta em maior quantidade o ácido linoleico (C18:2) para todas as espécies, seguido do ácido palmítico (C16:0) e em menor teor o ácido oleico (C18:1), encontrado apenas nas espécies *Morus nigra* e *Morus alba* (ERCISLI; ORHAN, 2007; JIANG; NIE, 2015).

Os frutos da espécie *Morus nigra* apresentam teor proteico entre 8,9 e 10,85%, já os da espécie *Morus alba* possuem valores maiores, entre 10,15 e 13,33% (SÁNCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2015). Além disso, observa-se a prevalência dos seguintes minerais nos frutos das espécies *Morus*: cálcio, magnésio, ferro, sódio, manganês, zinco, cobre e selênio (JIANG; NIE, 2015). Nas folhas, minerais em menores concentrações também são encontrados como o zinco, cálcio, potássio e magnésio, ferro e sódio (SÁNCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2017).

Salienta-se ainda, a presença do ácido ascórbico (Vitamina C) nos frutos da amoreira, que dentre suas principais funções destaca-se a prevenção e diminuição de danos oxidativos no organismo. Jiang e Nie (2015) relatam valores de 48,4 mg/100 g de ácido ascórbico nos frutos da amora preta. Em contrapartida, Ercisli e Orhan (2007) encontraram valores significativamente menores nos frutos da amora branca (22,4 mg/100 mL), da amora negra (21,8 mg/100 mL) e da amora vermelha (19,4 mg/100 mL).

A espécie *Morus* apresenta potencial nutracêutico e representa uma alternativa promissora para medicamentos alternativos a base de plantas medicinais (RODRIGUES *et al.*, 2019). Contudo, ainda são insuficientes os estudos com o propósito de obter conhecimento dos constituintes, potencial terapêutico e toxicidade de diversas partes (folhas, frutos, raiz, etc.) das espécies *Morus*, desta forma faz-se necessário a realização de mais pesquisas para a determinação principalmente da segurança no seu uso como planta medicinal.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar os efeitos dos extratos etanólico e aquoso da folha da amoreira (*Morus nigra* L.) em camundongos em uso de dieta hiperlipídica.

3.2 Específicos

Elaborar os extratos etanólico e aquoso das folhas da amoreira (*Morus nigra* L.).

Avaliar a toxicidade aguda do extrato etanólico e aquoso da folha da amoreira (*Morus nigra* L.).

Avaliar a ingestão alimentar e consumo calórico total dos animais.

Mensurar nos animais as alterações na composição corpórea: ganho de peso corporal e adiposidade.

Analisar as alterações no soro dos animais: perfil lipídico (triglicérides, colesterol total e frações) e perfil glicêmico (glicemia de jejum, teste de tolerância à glicose e sensibilidade à insulina).

Avaliar as alterações metabólicas no soro dos animais: concentração de TNF- α , IL-6, MCP-1, IL-10.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da matéria prima

As folhas da Amoreira (*Morus nigra* Linn) foram coletadas na cidade de Campo Grande - Mato Grosso do Sul (georreferenciamento: 20°29'43.120"S e 54°37'3.876" W), no período de julho/2018 de um espécime adulto. Foram selecionadas folhas totalmente íntegras, com a mesma intensidade de cor e diâmetro. A planta foi identificada pelo biólogo Prof. Dr. Flávio Macedo Alves e depositada no "Herbário CGMS" da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), exsicata n° 75816.

Após a coleta, as folhas foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar por 12 horas, a uma temperatura máxima de 40 °C. Após completa secagem, o material foi armazenado em sacos de papel e conduzido ao Instituto de Química da UFMS.

4.2 Preparação do extrato etanólico

Para obter o extrato etanólico, o material vegetal seco em estufa foi triturado em moinho de 4 facas até a obtenção de um pó fino. A amostra foi acondicionada para extração com etanol P.A. na proporção de 1:3 (folha: etanol v/v). Após um período de 24 horas o material vegetal com etanol foi filtrado com auxílio de papel filtro, de modo que o resíduo foi submetido a mais duas extrações nas mesmas circunstâncias. O extrato etanólico foi submetido ao rotaevaporador sob pressão reduzida, para evaporação do etanol e completa secagem em capela. O extrato etanólico seco foi armazenado em frasco de vidro a -18 °C até serem utilizados.

4.3 Preparação do extrato aquoso

Para o preparo do extrato aquoso, 100 g do pó fino de folhas secas foi submetido a uma extração por infusão em 2 L de água destilada aquecida a 90 °C. A mistura permaneceu descansando por 10 minutos tampado para abafar o vapor e

logo após foi filtrada com auxílio de gazes, o resíduo foi submetido a mais duas extrações, utilizando o mesmo procedimento. Posteriormente o material obtido foi liofilizado até a obtenção de um pó seco, que foi armazenado em recipiente de polietileno com tampa em temperatura de -18 °C e protegido da luz até a sua utilização (Adaptado ZENI; DALL’MOLIN, 2010).

4.4 Protocolo experimental

4.4.1 Parâmetros éticos

Todos os procedimentos realizados com os animais neste estudo foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) (Protocolo nº953/2018 – ANEXO A). A pesquisa diz respeito a um estudo experimental em modelo de obesidade e foi desenvolvida na sala de experimentação do Biotério Central, no Instituto de Química da UFMS e no Laboratório de Pesquisas em Ciências da Saúde (LPCS) em Dourados (MS), na Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

4.4.2 Teste de toxicidade aguda

Primeiramente foi realizado o teste de toxicidade aguda com o extrato etanólico e aquoso das folhas de *Morus nigra* em 15 Camundongos *Swiss*, fêmeas, de 12 semanas, nulíparas e não-prenhas. O teste de toxicidade aguda do extrato etanólico e aquoso da amoreira teve como base a *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) – Guidelines 425. Para o teste de toxicidade dos extratos, os animais foram distribuídos em 3 grupos (n=5): Controle que recebeu solução salina; grupo tratado com extrato etanólico e grupo tratado com extrato aquoso da *Morus nigra* L. na dose 2000 mg/kg, via oral, pelo método de gavagem. Após o tratamento, os animais foram observados nos primeiros 30 minutos, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 12h, 24h, e periodicamente durante 14 dias (OECD, 2008).

Simultaneamente foi realizado o teste de *screening* hipocrático (Anexo B) com a finalidade de quantificar efeitos dos extratos etanólico e aquoso da folha de amoreira sobre o estado de consciência e disposição, coordenação motora, tônus muscular, reflexos, atividade do sistema nervoso central, atividade do sistema nervoso autônomo, sugerido por Malone e Robichaud (1962). Ainda, alterações de peso corporal, ingestão hídrica e alimentar, assim como produção de excretas também foram avaliados (OECD, 2008).

Ao final dos 14 dias os animais foram submetidos a eutanásia por meio de dose letal do anestésico inalatório isoflurano (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Os órgãos (coração, pulmão, fígado, baço, pâncreas e rins) foram retirados, pesados e analisados macroscopicamente para averiguar uma possível alteração.

4.4.3 Composição das dietas

Durante o período experimental, os animais foram alimentados *ad libitum* com água e dieta para camundongos adultos, seguindo o protocolo da *American Institute of Nutrition* (AIN93-M) (REEVES; NIELSEN; FAHEY; 1993).

O grupo controle recebeu ração AIN93-M padrão e os demais grupos receberam dieta AIN93-M hiperlipídica (Tabela 3), que foi acrescida de banha de porco e colesterol como substituto de parte do amido de milho e óleo de soja, com o objetivo de aumentar o conteúdo calórico da dieta, induzir o ganho de peso e alterações metabólicas em animais. A composição da dieta hiperlipídica utilizada neste estudo foi adaptada do modelo experimental proposto por Lenquiste e colaboradores (2015). As rações foram elaboradas no laboratório da Unidade de Tecnologia de Alimentos UTA-UFMS.

Tabela 3 - Composição das dietas experimentais.

	Dieta AIN93-M	Dieta Hiperlipídica
Ingredientes (g/kg)		
Amido de milho	620,69	319,44
Caseína (≥ 85% de proteína)	140,00	140,00
Banha de porco	-	320,00
Colesterol	-	1,25
Açúcar	100,00	100,00
Óleo de soja	40,00	20,00
Celulose	50,00	50,00
Mistura mineral*	35,00	35,00
Mistura vitamínica**	10,00	10,00
L-cistina	1,80	1,80
Bitartarato de colina	2,50	2,50
Tertbutil hidroquinona	0,008	0,008
Energia (kcal/kg)	3.802,76	5.309,01
Carboidratos (%)	75,81	31,73
Proteínas (%)	14,73	10,56
Lipídeos (%)	9,47	57,71
Calorias/g dieta	3,80	5,30

Nota: *Minerais e **Vitaminas presentes na mistura estão de acordo com a AIN93-M.

4.4.4 Delineamento experimental

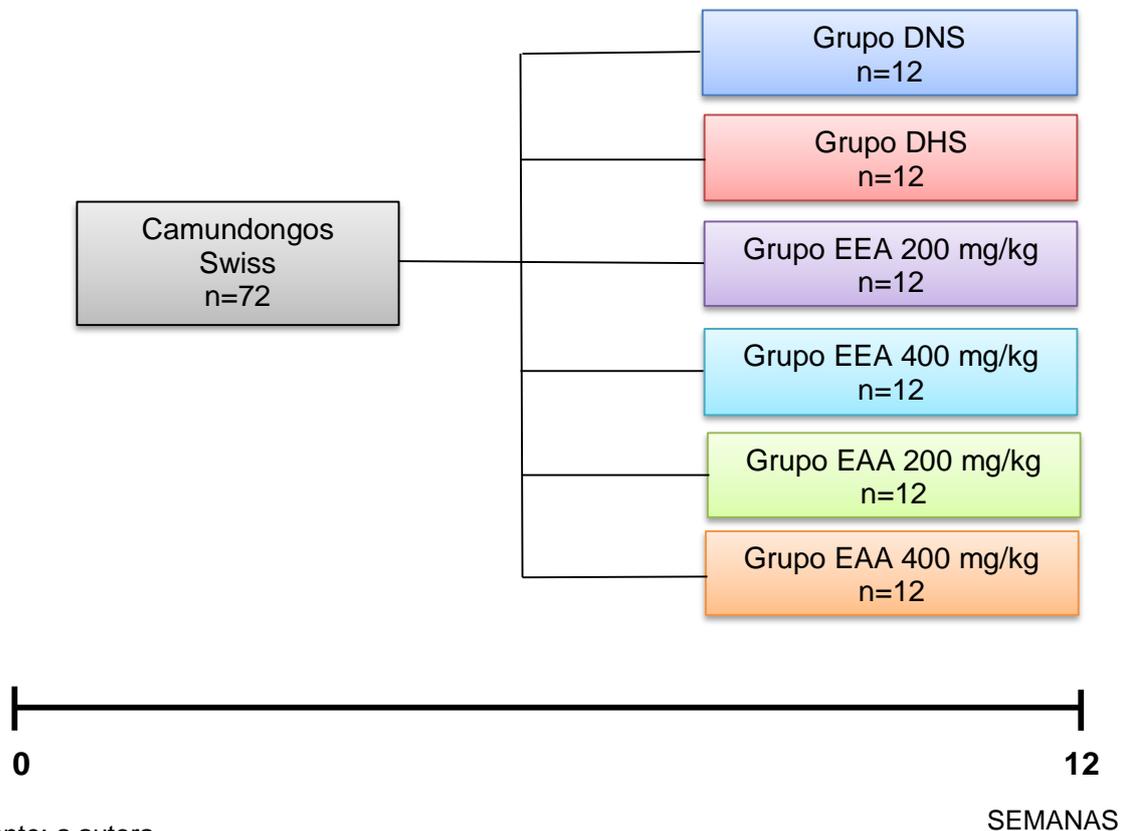
Para execução deste estudo foram utilizados camundongos *Swiss* machos com 12 semanas de vida, fornecidos pelo Biotério Central/UFMS, mantidos em temperatura em torno de 22 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 horas.

Os camundongos foram divididos em 6 grupos de acordo com o peso (para obter inicialmente grupos homogêneos), sendo cada grupo composto por 12 animais. A distribuição dos grupos foi da seguinte maneira: dieta normal e salina (DNS), dieta hiperlipídica e salina (DHS), dieta hiperlipídica e extrato etanólico de folhas da amoreira na concentração de 200 mg/kg (EEA200), dieta hiperlipídica e extrato etanólico de folhas da amoreira na concentração de 400 mg/kg (EEA400),

dieta hiperlipídica e extrato aquoso de folhas da amoreira na concentração de 200 mg/kg (EAA200) e dieta hiperlipídica e extrato aquoso de folhas da amoreira na concentração de 400 mg/kg (EAA400) (Figura 3) (Adaptado SILVA JÚNIOR *et al.*, 2017). O tratamento com salina (controle), extrato etanólico e aquoso de folhas da amoreira foi administrado via gavagem (via oral) por 12 semanas.

Ao final do período experimental, os animais foram submetidos a eutanásia inicialmente por meio de dose letal do anestésico inalatório isoflurano seguido por exsanguinação pela veia cava inferior após jejum de 10 horas. Amostras de sangue foram coletadas e o soro foi separado por centrifugação para análise bioquímica.

Figura 3. Delineamento experimental.



Fonte: a autora

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Controle do peso corporal

A evolução ponderal dos animais estudados foi acompanhada durante todo o período experimental. Os camundongos foram pesados duas vezes por semana utilizando balança digital Luxor® para avaliar o ganho de peso e para ajustar as doses dos extratos administradas diariamente por gavagem. O peso corporal foi expresso em gramas.

4.5.2 Avaliação da ingestão alimentar, eficácia alimentar e ganho de peso

A ingestão alimentar dos animais estudados foi avaliada durante todo o período experimental. O controle da ingestão de dieta foi monitorado 2 vezes na semana, verificando a quantidade de dieta oferecida aos animais e a quantidade restante, expressa em g/por animal consumida diariamente. A ingestão energética, expressa em Kcal/dia, foi calculada neste estudo pela multiplicação da quantidade de dieta consumida pelo valor densidade energética de cada dieta.

Foi calculado o coeficiente de eficácia alimentar (CEA), com a finalidade de determinar quanto um grama de ração consumida promove em aumento de peso corporal, obedecendo a seguinte equação:

$$\text{CEA} = (\text{PF} - \text{PI}) / \text{TA}$$

Onde, PF é peso corporal final em gramas, PI se refere ao peso corporal inicial em gramas e TA representa quantidade total da ração consumida em gramas (NERY *et al.*, 2011; SALERNO, 2014).

Foi utilizado também o cálculo do coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC), com o objetivo de analisar a capacidade do animal em converter energia alimentar consumida em peso corporal, seguindo a fórmula:

$$\text{CGPCC} = (\text{PF} - \text{PI}) / \text{kcal consumida}$$

Em que, PF representa o peso corporal final em gramas, PI equivale ao peso corporal inicial em gramas e Kcal consumida é o valor calórico da dieta consumida por cada animal (NERY *et al.*, 2011; SALERNO, 2014).

4.5.3 Avaliação da gordura corporal, peso do fígado e pâncreas

Após a eutanásia, o fígado, o pâncreas e os sítios de gorduras omental, epididimal, retroperitoneal, perirenal e do mesentérico de cada animal foram totalmente removidos e pesados em balança semi-analítica (Bel[®]), para comparação entre os grupos estudados. Os valores de peso dos tecidos foram expressos em gramas.

O índice de adiposidade foi calculado como a soma total dos sítios de tecido adiposo branco visceral (g) dividido pelo peso corporal final do animal x 100 e o resultado foi expresso em percentual de adiposidade (WHITE *et al.*, 2016).

4.6 Análises séricas

4.6.1 Perfil glicêmico: glicemia de jejum, teste de tolerância oral à glicose e sensibilidade à insulina

O teste oral de tolerância a glicose foi realizado 5 dias antes da eutanásia dos animais, após 6 horas em jejum. Primeiramente, foi feita a verificação da glicemia de jejum via caudal (tempo 0), com o uso de um glicosímetro da marca G-Tech[®], em seguida os animais receberam solução de D-glicose na concentração de 2 g/kg de peso corporal, por gavagem. A leitura da glicemia foi realizada nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a aplicação da glicose (SANTOS *et al.*, 2008).

O teste de sensibilidade à insulina foi realizado 3 dias antes da eutanásia. Com os animais em estado alimentado foi verificada a glicemia (tempo 0) com o auxílio do glicosímetro G-Tech[®]. Em seguida, foi injetado intraperitonealmente 0,75 UI de insulina (Novorapid[®] – 100 U/mL) por kg de peso do animal. A leitura da glicemia foi novamente realizada nos tempos 15, 30 e 60 minutos (SANTOS *et al.*, 2008).

As concentrações plasmáticas de glicose foram dosadas ao final do período experimental, utilizando o kit enzimático Labtest®. A análise foi realizada em uma microplaca de 96 poços, onde foram transferidos 2 µL de soro em duplicata e adicionados 200 µL do reagente utilizando uma micropipeta multicanal, inclusive no poço do branco. Para a determinação do padrão foi substituído 2 µL de amostra por 2 µL do padrão. Após incubação de 10 minutos a 37 °C, a absorbância foi lida a 505 nm, realizada em leitor de ELISA. Para o cálculo da concentração de glicose (mg/dL) foi utilizada a fórmula:

Glicemia (mg/dL) = (Média da absorbância da amostra/média da absorbância do padrão) x 100.

4.6.2 Perfil lipídico: triglicerídeos, colesterol total e frações e índice aterogênico

As concentrações plasmáticas dos triglicerídeos, colesterol total e colesterol-HDL foram determinados após o término do experimento utilizando kit enzimático Labtest Diagnóstica®, Brasil. A concentração de triglicerídeos (TG) séricos foi avaliada conforme o método enzimático colorimétrico (FOSSATI; PRINCIPE, 1982). Os níveis de colesterol total foram mensurados de acordo com o método colesterol oxidase (ALLAIN *et al.*, 1974). As concentrações de HDLc no soro foram obtidas através do kit enzimático LabTest Diagnóstica®, Brasil, de forma que seu princípio foi baseado na precipitação seletiva e quantitativa de LDL e de VLDL por meio do ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após a centrifugação (12000 rpm, por 4 minutos), o colesterol ligado às HDL foi determinado no sobrenadante. Os níveis de triglicerídeos, colesterol total e HDL foram obtidos por meio de ensaio em microplaca de 96 poços, conforme Fazio e colaboradores (1997). Posteriormente a leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplaca (Thermo Plate). A concentração final foi determinada mediante obtenção da curva dos padrões e sua equação, e a relação desta com a absorbância das amostras e as diluições utilizadas. Para o cálculo dos níveis de colesterol HDL, foi realizada a determinação do fator de calibração utilizando a seguinte equação:

$$F \text{ (Fator de calibração)} = 40 / \text{m\u00e9dia da absorv\u00e2ncia do padr\u00e3o}$$
$$\text{Colesterol HDL (mg/dL)} = \text{absorv\u00e2ncia da amostra} \times \text{fator de calibra\u00e7\u00e3o}$$

As concentra\u00e7\u00f5es plasm\u00e1ticas de colesterol VLDL e LDL (mg/dl) foram calculadas mediante \u00e0s seguintes f\u00f3rmulas:

$$\text{Colesterol VLDL} = \text{Triglicer\u00eddeos} / 5$$
$$\text{Colesterol LDL} = \text{Colesterol total} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$$

O n\u00e3o-HDL foi calculado atrav\u00e9s da F\u00f3rmula: Colesterol total – HDL

A determina\u00e7\u00e3o do \u00edndice aterog\u00eanico foi realizada a partir do c\u00e1lculo da raz\u00e3o entre o colesterol total e o colesterol-HDL (FLORENCE *et al.*, 2014).

4.6.3 Marcadores inflamat\u00f3rios: TNF-alfa, IL-6, IL-10 e MCP-1

O sangue coletado ap\u00f3s eutan\u00e1sia foi centrifugado e o sobrenadante armazenado em biofreezer \u00e0 -80 \u00b0C. Para a determina\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de citocinas presentes no soro, em um primeiro momento as amostras congeladas foram descongeladas, misturadas em v\u00f3rtice e centrifugadas para remover part\u00edculas. Em seguida foi utilizado o kit (Milliplex[®] Map Kit) para a quantifica\u00e7\u00e3o de citocinas. Todos os procedimentos para a realiza\u00e7\u00e3o desta an\u00e1lise foram realizados mediante manual do fabricante. Para a leitura da microplaca foi utilizado o leitor Magpix[®] Powered by Luminex XMAP Technology. Foram realizadas as dosagens de TNF-alfa, IL-6, IL-10 e MCP-1.

4.7 An\u00e1lise estat\u00edstica

Os resultados foram expressos em m\u00e9dia \pm erro padr\u00e3o da m\u00e9dia. A an\u00e1lise de vari\u00e2ncia (ANOVA) foi utilizado para compara\u00e7\u00e3o m\u00faltipla de resultados param\u00e9tricos, seguido de p\u00f3s teste de Tukey, e para os dados n\u00e3o param\u00e9tricos Kruskal-Wallis e Friedman seguido de p\u00f3s teste de Dunn's. Para a realiza\u00e7\u00e3o da an\u00e1lise estat\u00edstica utilizou-se o *software* Sigma Stat, vers\u00e3o 3.5 (Systat software, Inc., USA). O programa estat\u00edstico Bioestat 5.0 foi utilizado para avalia\u00e7\u00e3o do perfil

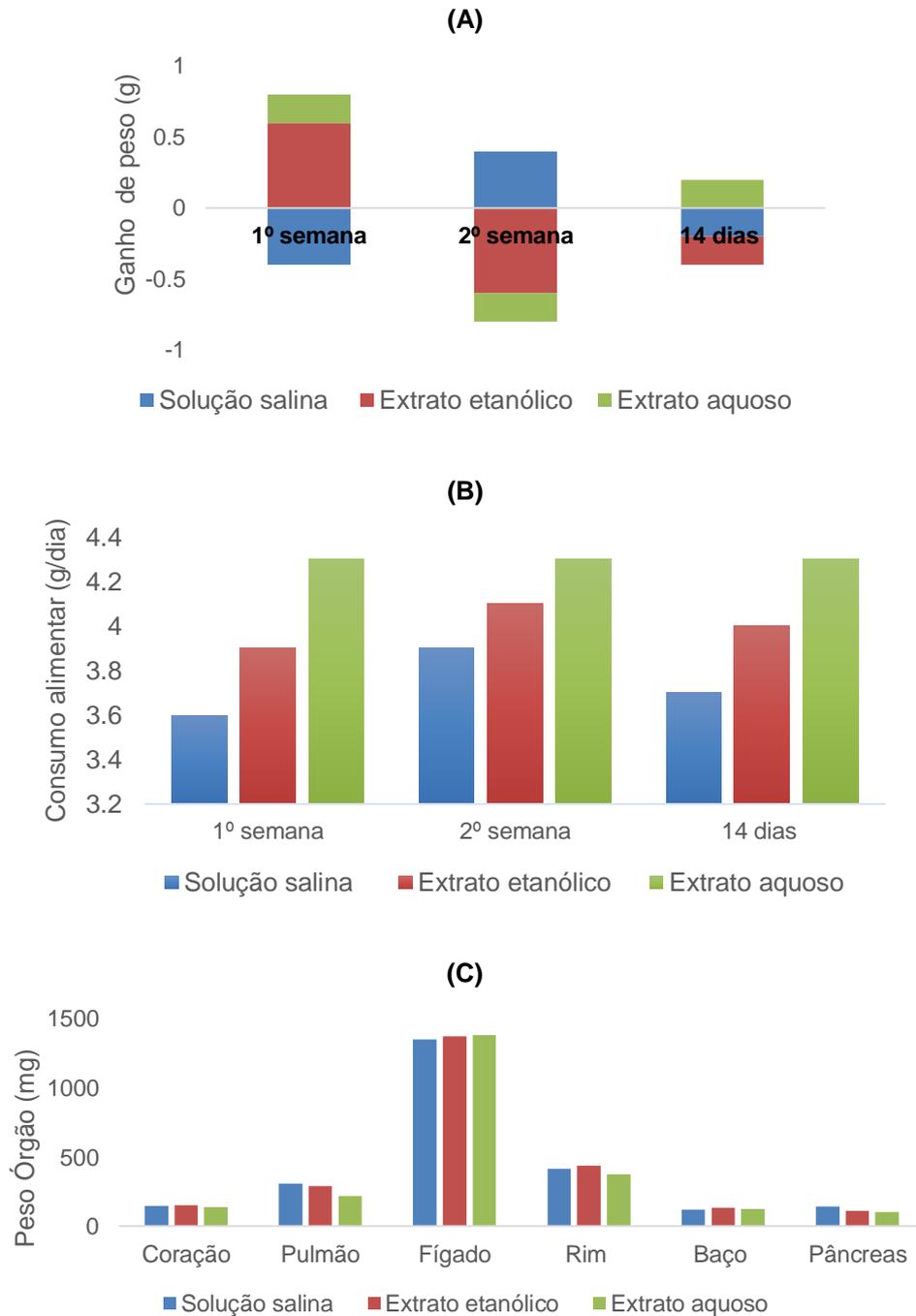
glicêmico. Para apresentação dos dados foi utilizado o programa Excel 2016. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o teste de toxicidade aguda os extratos etanólico e aquoso das folhas da amoreira foram administrados via gavagem na concentração de 2000 mg/kg em camundongos Swiss fêmeas. Os resultados (Figura 4) indicaram que não houve diferença estatística no ganho de peso corporal e consumo alimentar dos animais, também não foi observado alterações na ingestão hídrica, excreção de urina e fezes. Ainda, no teste *Screening* Hipocrático (ANEXO B) não foi observada alteração motora e/ou sensorial, neurológica, assim como não houve morte de nenhum animal.

Bem como, não foram encontradas alterações macroscópicas no fígado, baço, pâncreas, pulmões, coração e rins dos animais e, não houve diferença significativa entre os grupos no peso dos órgãos (Figura 4).

Figura 4 - Ganho de peso corporal, consumo alimentar e peso dos órgãos dos animais do teste de toxicidade aguda.



Nota: **(A)** Ganho de peso Corporal (g); **(B)** Consumo alimentar (g/dia); **(C)** Peso de órgãos (mg) de animais controles e tratados com extratos etanólico e aquoso da folha de amoreira na dose de 2000 mg/kg por 14 dias. Os valores representam a média \pm erro padrão da média. $p \geq 0,05$. (ANOVA/Kruskal-Wallis).

Estes resultados inferem que a DL₅₀ (dose letal 50% - dose que mata 50% dos animais) dos extratos etanólico e aquoso da folha da amoreira seja superior a 2000 mg/kg de peso corporal.

A toxicidade subcrônica do chá das folhas de *Morus nigra* foi avaliada com a administração de 500 mL do chá por via oral durante o período de 30 dias em ratos *Wistar*, ao final do experimento foi observado que não houve morte nem sinais de toxicidade (alterações de peso ou consumo) nos animais, o que também foi observado neste estudo. Além disso, não provocou alteração nos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Ainda, em estudo realizado por Almeida e colaboradores (2011) foi avaliada a toxicidade aguda do extrato etanólico bruto das folhas de *Morus nigra*, os autores concluíram que o extrato pode ser considerado de baixa toxicidade, visto que não provocou morte nem alteração nos parâmetros bioquímicos e hematológicos nos animais após administração de doses de 5 g/kg e 2 g/kg, por via oral e intraperitoneal, respectivamente (ALMEIDA *et al.*, 2011).

Em relação aos resultados do peso corporal dos animais dos grupos de estudo, nota-se que o experimento iniciou (1º dia) com peso médio sem diferença estatística entre os grupos controles (DNS, DHS) e experimentais (EEA 200mg/kg e 400mg/kg, EAA 200mg/kg e 400mg/kg), ou seja, partiu-se de grupos semelhantes em relação a este parâmetro. Já ao final do experimento observou-se que os grupos EAA200, EEA400, EEA200 apresentaram maior ganho de peso, respectivamente, quando comparados ao grupo controle DNS apresentando diferença estatística ($p < 0,001$). Os dados dos pesos iniciais e finais estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Peso inicial e final, ganho de peso, ingestão alimentar de animais controles e tratados com extrato etanólico e aquoso das folhas de amoreira.

Parâmetros	Grupos experimentais					
	DNS	DHS	EEA 200	EEA 400	EAA 200	EAA 400
Peso inicial (g) ¹	34,30±1,95	34,50±2,22	34,67±2,15	34,50±2,88	34,18±2,52	34,54±2,38
Peso final (g) ¹	43,90±5,59	47,40±6,25	51,75±8,10*	52,70±5,19*	54,73±3,58*	50,82±4,73
Ganho de peso total (g) ²	9,60±4,55	12,90±5,82	17,08±6,79*	18,20±4,29*	20,54±3,20 [#]	16,27±3,69
Ingestão alimentar (g/dia) ²	4,54±0,20	3,37±0,26*	3,23±0,32*	3,44±0,37*	3,68±0,21	3,33±0,56*
Ingestão alimentar (kcal/dia) ²	17,26±0,77	17,86±1,38	17,13±1,67	18,22±1,95	19,52±1,11 ^{**}	17,63±2,97
CEA ²	0,02±0,01	0,04±0,02	0,06±0,02*	0,06±0,01*	0,06±0,01*	0,05±0,01*
CGPCC ¹	0,0044±0,002	0,008±0,003	0,011±0,005*	0,011±0,002*	0,011±0,003*	0,010±0,002*

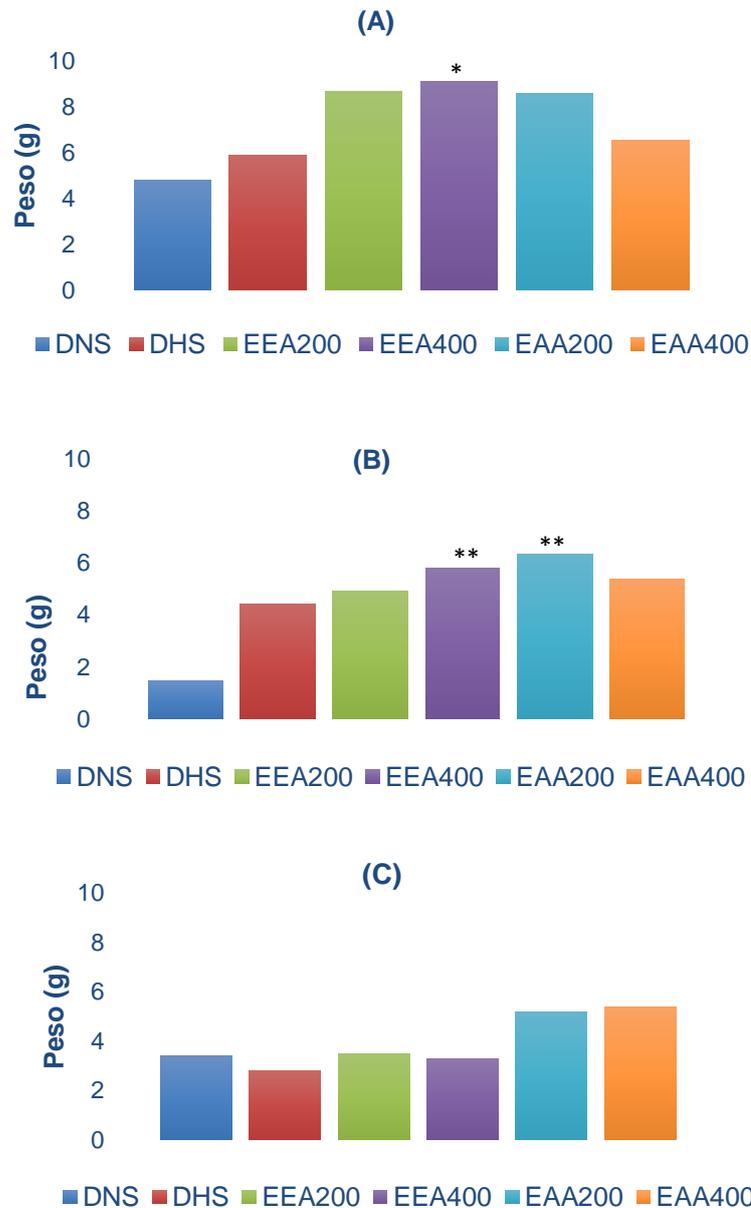
Nota: Peso inicial e final, ganho de peso, ingestão alimentar (g/dia), ingestão alimentar (kcal/dia), Coeficiente de eficácia alimentar (CEA) e peso por consumo calórico (CGPCC) de animais controles (DNS – dieta padrão, DHS – dieta hiperlipídica) e tratados com extrato etanólico (EEA) e aquoso (EAA) de folhas de amoreira nas doses de 200 e 400 mg/kg, entre a 1^a e 12^a semana de estudo. Os valores representam a média ± erro padrão da média. Na mesma linha, *p<0,001 vs DNS, [#] p<0,001 vs DHS, ^{**} p<0,036 vs DNS (¹ANOVA/ Tukey, ²Kruskal-wallis/ Dunn's).

Analisando o ganho de peso mensalmente (Figura 5), observa-se que ao término do primeiro mês de oferta da dieta hiperlipídica e respectivos tratamentos, houve maior média de ganho de peso pelos grupos que recebiam tal dieta em relação ao grupo DNS, porém o grupo EEA400 (9,10g) obteve maior ganho de peso, diferindo estatisticamente ($p=0,017$) do grupo controle DNS.

Ao final do segundo mês, manteve-se o maior ganho de peso nos grupos que recebiam dieta hiperlipídica e os tratamentos em relação ao grupo com dieta normal, contudo neste mês além do grupo EEA400 (5,80g), o grupo EAA200 (6,36g) também diferiu estatisticamente ($p=0,008$) do grupo DNS.

Na finalização do terceiro mês os grupos não apresentaram diferença significativa na comparação entre si ($p=0,111$), entretanto vale ressaltar que o grupo com tratamento EEA400 apresentou uma redução no ganho de peso, indicando que possivelmente o uso prolongado traria uma proteção. Por outro lado, os grupos tratados com EAA200 (5,18g) e EAA400 (5,36g) tiveram as maiores médias de ganho de peso, valores superiores inclusive ao grupo DHS (2,80 g).

Figura 5 - Ganho de peso dos diferentes grupos experimentais nos 1º, 2º e 3º mês.



Nota: **(A)** 1º mês, **(B)** 2º mês, **(C)** 3º mês de animais controles (DNS – dieta padrão, DHS – dieta hiperlipídica) e tratados com extrato etanólico (EEA) e aquoso (EAA) de folhas de amoreira nas doses de 200 e 400 mg/kg. Os valores representam a média \pm erro padrão da média. * $p=0,017$ vs DNS. ** $p=0,008$ vs DNS. $p=0,111$. (¹Kruskal-wallis/ Dunn's; ²ANOVA).

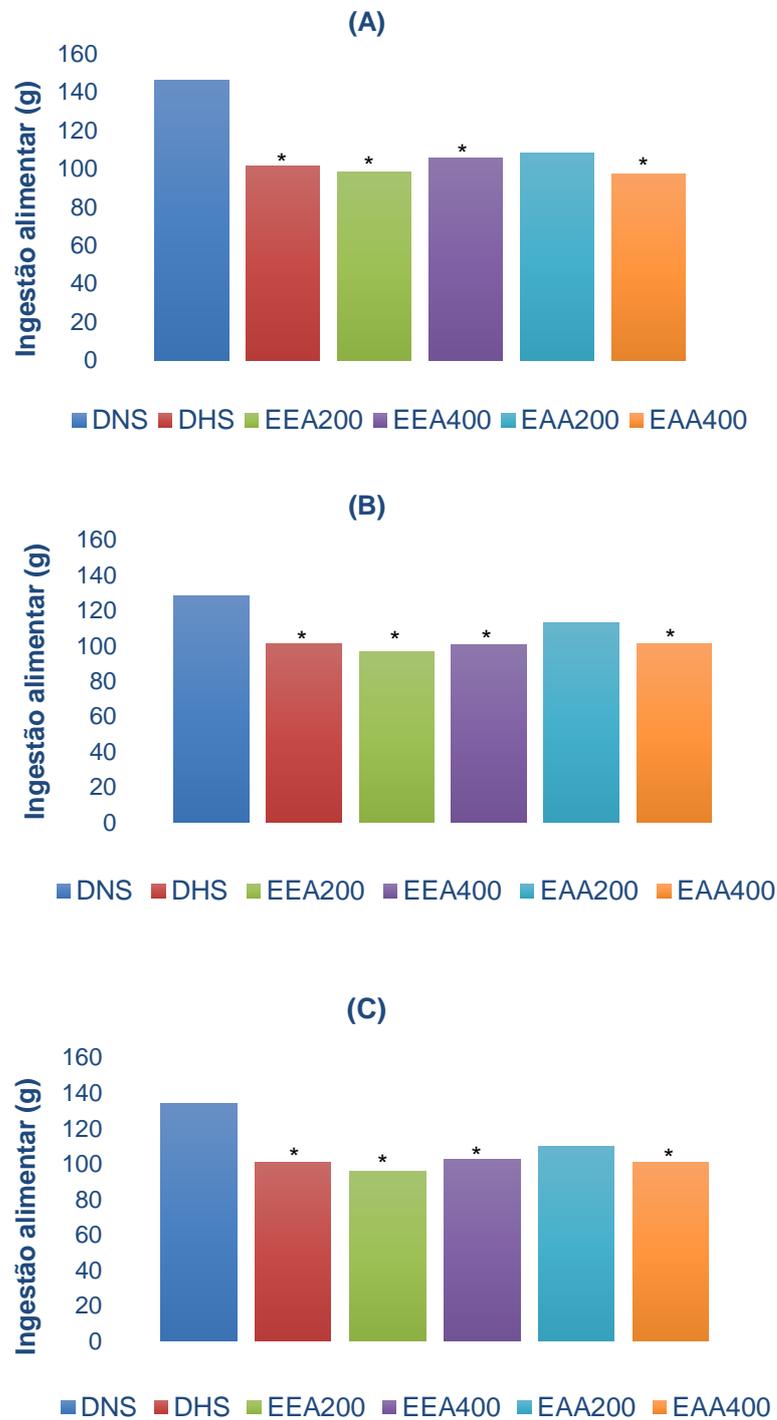
Ainda, ao final do período experimental, foi calculado o ganho de peso total, pela diferença entre o peso corporal final e inicial dos animais. Os grupos EEA200, EEA400 e EAA200 apresentaram diferença estatística comparados ao grupo controle DNS. Destaca-se que o grupo que teve o maior ganho de peso foi o grupo EAA200 que também diferiu estatisticamente do grupo DHS. Os dados de ganho de peso total estão representados na Tabela 4.

A obesidade induzida por dieta com alto teor de gordura é um modelo usualmente utilizado por pesquisadores uma vez que similarmente aos seres humanos os animais ganham peso corporal e desenvolvem alterações metabólicas associadas à obesidade (WHITE *et al.*, 2016). Foi possível observar neste estudo que, como o mencionado acima, os grupos alimentados com dieta hiperlipídica demonstraram maior ganho de peso quando comparados com os animais do grupo controle DNS. Este ganho de peso em animais que são tratados com dieta hiperlipídica também foi observado no estudo de White *et al.* (2016), onde após 4 semanas já foi possível observar diferença significativa no peso corporal em relação ao grupo controle.

No presente estudo, o uso dos extratos etanólico e aquoso da folha da amoreira não protegeu contra o ganho de peso, comparando-se ao grupo hiperlipídico não tratado, o que nos faz pensar que novos estudos utilizando estes extratos da folha da amoreira serão necessários, podendo apresentar resultados diferentes aos observados. De qualquer forma, no atual estudo, especialmente o grupo EAA400 obteve uma possível proteção no ganho de peso total.

No que diz respeito a ingestão alimentar diária (Tabela 4) foi possível observar que os grupos DNS e EAA200 apresentaram média de consumo maior em relação aos grupos DHS, EEA200, EEA400 e EAA400, com diferença estatística ($p < 0,001$). Este padrão de consumo permaneceu quando analisamos a ingestão alimentar mensal (Figura 6).

Figura 6 - Ingestão alimentar dos diferentes grupos experimentais nos 1º, 2º e 3º mês.



Nota: **(A)** 1º mês, **(B)** 2º mês, **(C)** 3º mês dos animais controles (DNS – dieta padrão, DHS – dieta hiperlipídica) e tratados com extrato etanólico (EEA) e aquoso (EAA) de folhas da amoreira nas doses de 200 e 400 mg/kg. Os valores representam a média \pm erro padrão da média. *p<0,001 vs DNS. (Kruskal-wallis/ Dunn's).

O maior teor de gordura presente na dieta hiperlipídica leva ao aumento da saciedade e conseqüentemente a menor eficiência alimentar, o que pode explicar o menor consumo alimentar dos animais que receberam esta dieta em comparação ao grupo DNS (SCHWARTZ *et al.*, 2008). Ainda pode-se citar o comportamento do grupo EAA200, que no decorrer do estudo, mesmo recebendo dieta hipercalórica, assim como os demais grupos, apresentou uma ingestão alimentar maior, fato que foi representativo pois como visto na tabela 4 foi o grupo com maior ganho de peso.

Quanto a ingestão calórica diária (Tabela 4), foi possível observar diferença estatística significativa apenas entre o grupo EAA200 e o grupo controle DNS ($p < 0,036$). Este resultado corrobora com os resultados anteriores, visto que este grupo demonstrou maior consumo e maior ganho de peso.

Na avaliação dos parâmetros CEA e CGPCC (Tabela 4) os grupos experimentais estudados evidenciaram valores significativamente maiores ($p < 0,001$) quando comparados ao grupo DNS, demonstrando que não houve uma tendência das substâncias a promoverem uma saciedade nos animais e dessa forma, menor ganho de peso por consumo calórico.

Ao analisar os resultados dos parâmetros bioquímicos (Tabela 5) nota-se que os grupos DHS, EEA200, EAA200 e EAA400 obtiveram níveis de triglicerídeos e VLDL significativamente menores quando comparados ao grupo DNS. Uma possível explicação para o maior nível de triglicerídeos observado no grupo DNS é o maior teor de carboidrato presente na ração destes animais. Uma vez que, o excesso de carboidratos não utilizado como energia ou armazenado sob a forma de glicogênio é convertido em triglicerídeos, produzidos especialmente pelo fígado e armazenado no tecido adiposo (GUYTON; HALL, 2011).

Tabela 5 - Perfil lipídico e glicemia de jejum de animais controles e tratados com extrato etanólico e aquoso das folhas de amoreira.

Parâmetros	Grupos experimentais					
	DNS	DHS	EEA 200	EEA 400	EAA 200	EAA 400
Colesterol (mg/dL) ²	213,14±30,76	226,77±32,97	221,67±35,98	252,29±28,71	242,90±45,56	252,74±14,34
Triglicerídeos (mg/dL) ¹	172,46±23,04	134,18±12,14*	132,97±18,91*	152,77±7,31	146,15±19,73*	146,70±19,55*
HDL(mg/dL) ²	165,89±38,3	179,96±29,28	177,88±31,67	202,96±25,57	198,26±40,08	214,33±12,08*
VLDL (mg/dL) ¹	34,49±4,61	26,84±2,43*	26,59±3,78*	30,55±1,46	29,23±3,95*	29,34±3,91*
LDL (mg/dL) ¹	7,85±5,86	12,32±10,80	9,62±7,60	13,77±8,56	4,85±3,43	7,13±2,60
Não-HDL (mg/dL) ²	46,76±11,98	46,81±18,56	43,79±15,54	49,33±13,35	34,37±6,91**	36,27±3,94
Índice aterogenico ¹	1,26±0,08	1,27±0,11	1,25±0,10	1,25±0,07	1,20±0,08	1,18±0,02
Glicose de jejum (mg/dL) ¹	258,61±54,94	283,13±62,74	271,73±37,13	297,73±34,48	274,86±48,34	302,93±24,88

Nota: Perfil lipídico e glicose de jejum de animais controles (DNS – dieta padrão, DHS – dieta hiperlipídica) e tratados com extrato etanólico (EEA) e aquoso (EAA) de folhas de amoreira nas doses de 200 e 400 mg/kg, entre a 1^a e 12^a semana de estudo. Os valores representam a média ± erro padrão da média. Na mesma linha, * p≤ 0,05 vs DNS, **p≤ 0,05 vs EEA400. (¹ANOVA/ Tukey, ²Kruskal-wallis/ Dunn's).

Em relação ao Não-HDL, o grupo EAA200 foi estatisticamente menor apenas que o grupo EEA400 ($p \leq 0,05$). Ao mensurar o Não-HDL são incluídas as frações de lipoproteínas consideradas aterogênicas: IDL, LDL e VLDL, demonstrando correlação entre o não-HDL e doenças coronarianas (SILVA *et al.*, 2009). No presente estudo o extrato aquoso contribuiu para menores concentrações plasmáticas de Não-HDL, estando possivelmente relacionado com a diminuição do risco cardiovascular, especialmente para o grupo EAA200 que como visto anteriormente obteve maior ganho de peso.

Além disso, verificou-se níveis elevados de HDL no grupo EAA400, quando comparado ao grupo DNS, não diferindo significativamente entre os demais grupos. Já é um consenso que o HDL atua com fator protetor contra doenças cardiovasculares, e seu aumento é considerado benéfico para o indivíduo, especialmente para aqueles com outros fatores de risco associados (NESAN; NG, 2014), desta forma, este resultado também indica que o extrato aquoso da folha de amoreira possui provável benefício cardiovascular.

Observa-se que a administração diária dos extratos etanólico e aquoso não foi capaz de alterar significativamente as concentrações séricas de colesterol total e LDL, assim como o índice aterogênico, já que não houve diferença estatística nestes parâmetros entre os grupos de estudo.

Em outros estudos a partir da utilização do extrato etanólico de frutos de *Morus nigra* (210 mg/kg de peso corporal) observou-se diminuição dos níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos, LDL-c e VLDL-c, além de um aumento nos níveis de HDL-c e das atividades enzimáticas anti-oxidativas e redução de lesões ateroscleróticas arteriais em ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta hiperlipídica (JIANG *et al.*, 2017). Fato presumivelmente atribuído às suas propriedades nutricionais, como a presença de antocianinas ou a ação conjunta de antocianinas, polifenóis e flavonoides (JIANG *et al.*, 2017; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2017).

Ainda, Zeni *et al.* (2017) avaliaram o efeito hipolipemiante da infusão de folhas de *Morus nigra* usando ratos Wistar hiperlipidêmicos induzidos por Triton WR-1339. Após o tratamento com 100 mg/kg de extrato de *Morus nigra* o nível de LDL-c diminuiu significativamente. Além disso, todos os grupos tratados com o extrato em três concentrações diferentes (100, 200 e 400 mg/kg) tiveram os níveis de HDL-c restaurados, comparados àqueles tratados apenas com Triton WR-1339. O índice

aterogênico e o fator de risco cardíaco, indicadores de probabilidade de doenças cardiovasculares associadas à hiperlipidemia, também diminuíram pelo extrato de *Morus nigra*.

Quanto à concentração sérica de glicose de jejum, não se observou diferença significativa entre os grupos de animais ($p=0,239$), sendo que os seis grupos estudados apresentaram concentrações plasmáticas semelhantes, porém os valores mostraram-se elevados ao comparar com a referência para animais saudáveis da literatura (CASTELLO BRANCO *et al.*, 2011; LIMA *et al.*, 2014). Indicando que em nosso modelo experimental, os efeitos benéficos dos extratos etanólico e aquoso da *Morus nigra* no controle da glicemia não puderam ser suportados.

Um fator importante é a composição das dietas utilizadas neste estudo, as quais foram elaboradas com alimentos ricos em carboidratos simples. Em vista disso, a quantidade e a qualidade do carboidrato que compõe a dieta reflete diretamente na glicemia (SILVA; MURA, 2010).

Vale lembrar ainda, que os animais podem exibir variações influenciadas por diversos fatores os quais devem ser considerados nos estudos experimentais, desta forma é necessário que cada biotério estabeleça valores de referência próprios para parâmetros bioquímicos e hematológicos (CASTELLO BRANCO *et al.*, 2011).

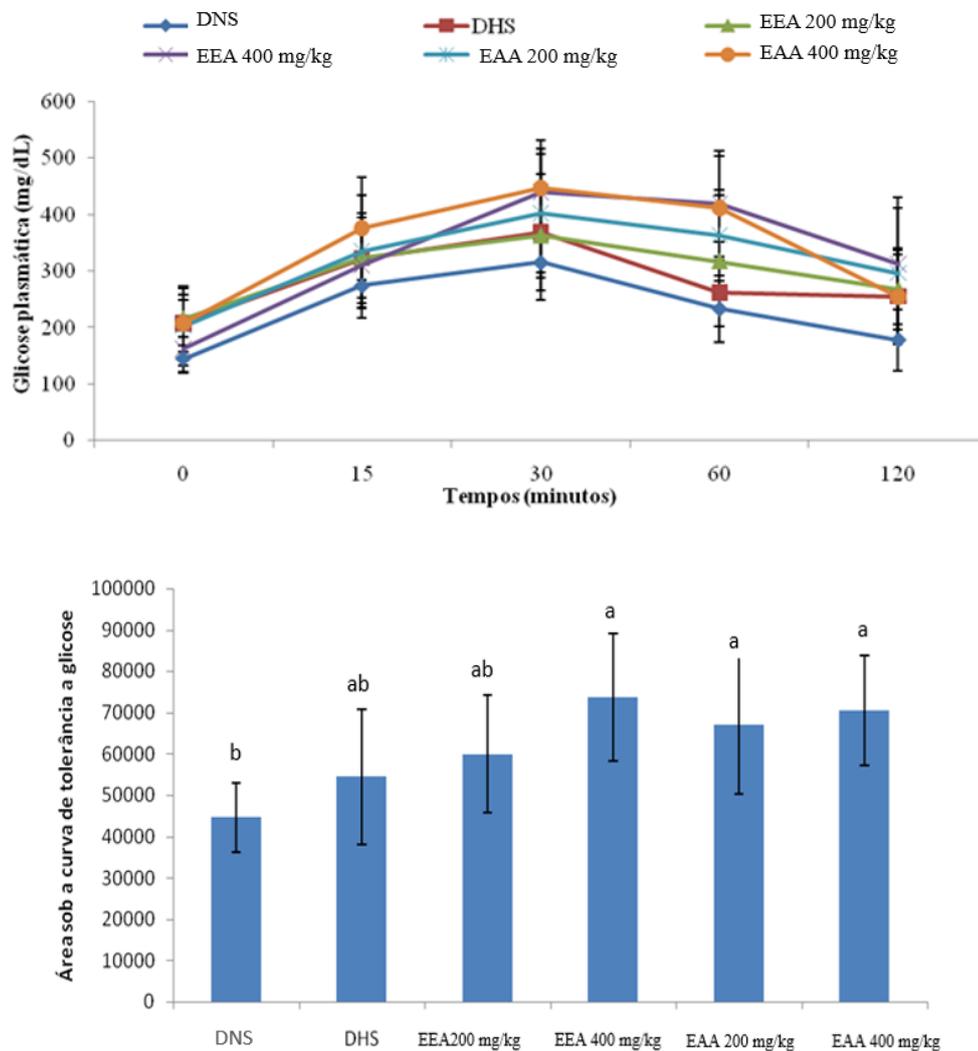
Ao realizar o teste de tolerância oral à glicose ao término do período experimental (Figura 7), foi observado que o nível glicêmico sofreu alterações ao longo do tempo de análise, em todas as dietas testadas ($p<0,0001$). Em todos os grupos, o tempo 30 minutos apresentou o maior nível glicêmico e os tempos 0 e 120 minutos apresentaram os menores níveis glicêmicos. Ressalta-se que apenas no grupo EEA400 o tempo 15 minutos foi inferior aos 30 minutos ($p<0,05$), os demais grupos, não apresentaram diferenças entre as concentrações glicêmicas destes períodos ($p>0,05$).

Foram significativas as variações entre os níveis glicêmicos dos seis grupos analisados nos tempos 0 (zero), 30, 60 e 120 minutos ($p<0,05$), sendo que apenas no tempo 15 minutos os valores não diferiram ($p=0,14$). Nos tempos onde houve variações, o grupo DNS apresentou menores níveis glicêmicos ($p<0,05$).

No tempo 0 (zero), o nível glicêmico do EEA200 foi significativamente maior que da dieta EEA400 ($p<0,05$). Ainda, no tempo 60 minutos, os níveis glicêmicos dos grupos EEA400 e EAA400 foram superiores também ao grupo DHS ($p<0,05$).

Na análise da área sob a curva de tolerância à glicemia (Figura 7) foi identificado que o grupo DNS apresentou valores significativamente menores em relação aos grupos EEA400, EAA200 e EAA400. Ou seja, apenas o grupo que recebeu o EEA 200mg/kg apresentou comportamento glicêmico semelhante ao grupo controle, mesmo recebendo dieta hiperlipídica.

Figura 7 - Teste de tolerância oral à glicose e a área da curva glicêmica dos diferentes grupos experimentais.



Nota: animais controles (DNS – dieta padrão, DHS – dieta hiperlipídica) e tratados com extrato etanólico (EEA) e aquoso (EAA) de folhas de amoreira nas doses de 200 e 400 mg/kg. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Letras diferentes indicam as diferenças entre os grupos

No estudo de Silva Júnior *et al.* (2017), o extrato etanólico de folhas de *Morus nigra* na concentração de 400 mg/kg/dia melhorou a tolerância oral à glicose, além

de reduzir a glicemia em jejum e pós-prandial, a lipólise e proteólise em ratos diabéticos induzidos por aloxano.

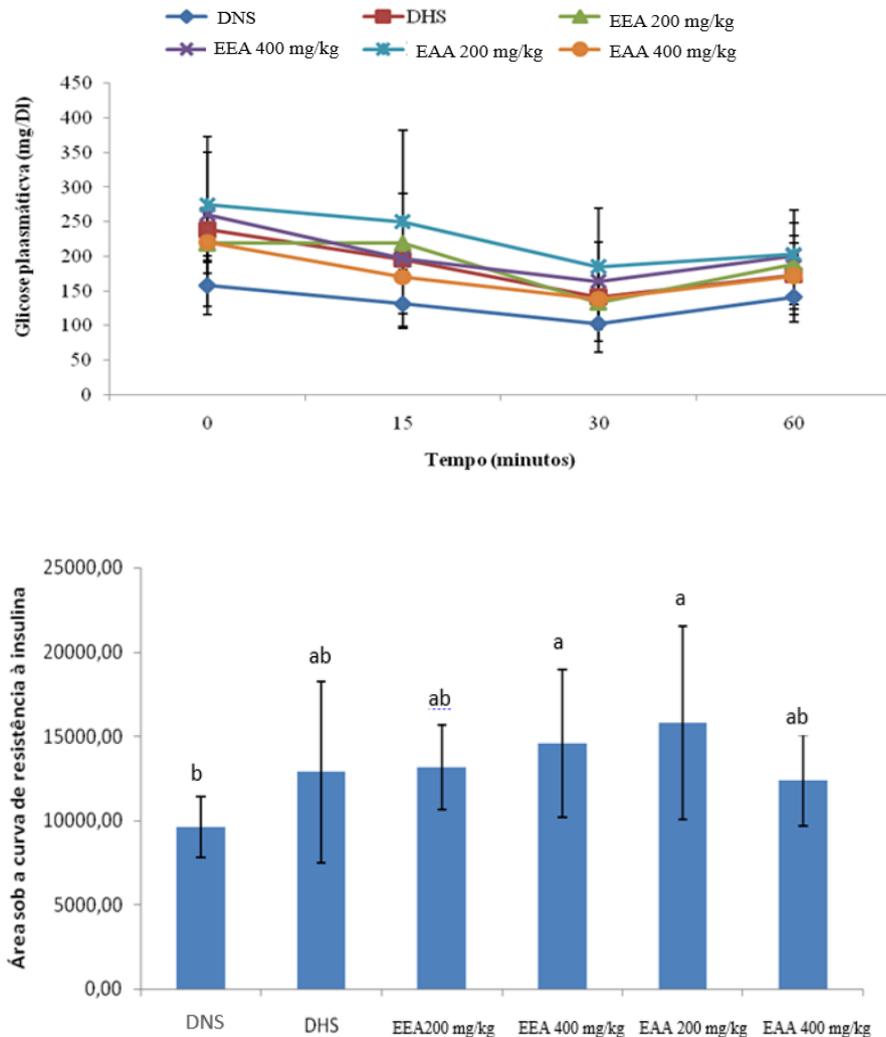
No entanto, assim como neste estudo, o chá das folhas de *Morus alba* em duas concentrações diferentes (0,25% e 0,50%) não exibiu efeito hipoglicêmico, uma vez que foi incapaz de corrigir a intolerância à glicose e a resistência à insulina em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (WILSON; ISLAM, 2015).

O teste de sensibilidade à insulina foi realizado ao final do período experimental, no qual se observou que a resistência à insulina se modificou em todos os grupos ao longo do tempo de análise ($p < 0,05$), sendo que o tempo 30 minutos foi significativamente menor que os demais em todos os grupos (Figura 8).

Foi identificada diferença na resistência à insulina entre os grupos nos tempos 0, 15 e 30 minutos ($p < 0,05$), sendo que o grupo DNS apresentou valores significativamente menores em relação ao EAA200. O grupo dieta normal também apresentou menores valores que os grupos EEA400 e EAA400, quando no tempo 0 de análise ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos no tempo 60 minutos ($p = 0,14$).

Na análise da área sob a curva de sensibilidade à insulina foi identificado que o grupo DNS apresentou valores significativamente menores em relação ao grupo EEA400 e EAA200 (Figura 8). Ou seja, mesmo os animais recebendo dieta hiperlipídica os extratos etanólico e aquoso em sua menor e maior concentração respectivamente, permitiram que fosse mantido o mesmo comportamento glicêmico que o grupo controle.

Figura 8 - Teste de sensibilidade à insulina e a área da curva glicêmica dos diferentes grupos experimentais.



Nota: animais controles (DNS – dieta padrão, DHS – dieta hiperlipídica) e tratados com extrato etanólico (EEA) e aquoso (EAA) de folhas de amoreira nas doses de 200 e 400 mg/kg. Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's. Letras diferentes indicam as diferenças entre os grupos.

Król e colaboradores (2016) trazem em seu estudo que a oferta de dois tipos de extratos (acetônico e etanólico 65%) das folhas de *Morus alba*, em ratos diabéticos alimentados com dieta *high fat* durante quatro semanas, demonstrou efeitos hipoglicemiantes e aumentaram a sensibilidade à insulina, sendo o extrato etanólico o que apresentou melhores resultados.

Os coxins de tecido adiposo, fígado e pâncreas foram avaliados ao final do tratamento. Os resultados demonstraram que os extratos etanólico e aquoso da folha de amoreira nas doses estudadas não foram capazes de reduzir significativamente a adiposidade visceral nos animais, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Efeito dos extratos etanólico e aquoso das folhas de amoreira sobre os coxins adiposos, Índice de adiposidade, peso do fígado e pâncreas.

Parâmetros	Grupos experimentais					
	DNS	DHS	EEA200	EEA400	EAA200	EAA 400
Peso omental (g) ¹	0,07±0,03	0,09±0,01	0,14±0,05*#	0,13±0,03*	0,11±0,04	0,10±0,03
Peso epididimal (g) ¹	2,08±0,78	1,93±0,53	2,49±1,02	2,08±0,78	2,50±0,80	2,79±0,65
Peso mesentérico (g) ¹	1,14±0,49	1,13±0,49	1,57±0,68	1,34±0,35	1,61±0,47	1,27±0,36
Peso retroperitoneal (g) ¹	0,87±0,39	0,75±0,26	1,08±0,40	1,11±0,50	0,93±0,32	0,87±0,27
Peso perirrenal (g) ¹	0,37±0,23	0,29±0,11	0,43±0,17	0,44±0,16	0,42±0,13	0,36±0,11
Peso dos coxins (g/total) ¹	4,48±1,75	4,24±1,21	5,83±1,77	5,09±0,87	5,56±1,28	5,44±0,98
Índice de adiposidade (%) ¹	9,90±2,95	8,86±1,85	11,12±2,19	9,65±1,30	10,55±2,05	10,68±1,42
Fígado (g) ²	1,55±0,26	2,13±0,48	2,10±0,57	2,38±0,55*	3,11±1,11*	2,06±0,43
Pâncreas (g) ¹	0,12±0,02	0,11±0,03	0,11±0,03	0,12±0,02	0,11±0,02	0,12±0,01

Nota: Peso dos coxins adiposos, fígado e pâncreas e índice de adiposidade de animais controles (DNS – dieta padrão, DHS – dieta hiperlipídica) e tratados com extrato etanólico (EEA) e aquoso (EAA) de folhas de amoreira nas doses de 200 e 400 mg/kg, entre a 1ª e 12ª semana de estudo. Valores representam a média ± erro padrão da média. Na mesma linha, *p<0,001 vs DNS, #p<0,001 vs DHS. (¹ANOVA/ Tukey, ²Kruskal-wallis/ Dunn´s).

Quando analisado o peso dos coxins separadamente observa-se que os tecidos epididimal, perirrenal, retroperitoneal e mesentérico não demonstrou diferença estatística entre os grupos de estudo ($p \geq 0,05$), no entanto foi observado aumento significativo do tecido adiposo omental nos grupos que receberam o extrato etanólico nas duas concentrações em comparação ao grupo DNS ($p < 0,001$). Acrescenta-se que o grupo EEA200 também demonstrou diferença significativa ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo DHS (Tabela 6).

Do mesmo modo, não houve diferença significativa entre os grupos estudados quando analisado o somatório dos coxins e o índice de adiposidade, porém considerando que o parâmetro de índice de adiposidade é dado pela soma de todos os coxins de tecido adiposo visceral branco, dividido pelo peso corporal final de cada animal, pode-se afirmar que os grupos que receberam os extratos acumularam maior quantidade de tecido adiposo em resposta ao ganho de peso total destes animais, que foram superiores inclusive ao grupo DHS (Tabela 6).

Em relação ao peso dos órgãos fígado e pâncreas os resultados apontam diferença estatística ($p < 0,001$) apenas no peso do fígado dos animais dos grupos EEA400 e EAA200 em comparação ao grupo DNS, indicando maior deposição de gordura hepática nestes animais (Tabela 6).

Segundo Silva *et al.* (2015) a composição da dieta pode ocasionar alteração do peso dos órgãos dos animais, por exemplo, os que recebem dieta hiperlipídica apresentam maior peso do fígado, devido a maior deposição de gordura hepática, em comparação aos animais que consomem dieta padrão, o que foi possível observar neste estudo.

Com relação aos marcadores inflamatórios os resultados demonstraram que a concentração de IL-6 foi significativamente maior no grupo DHS (21,16 pg/mg) quando comparado ao grupo DNS (2,82 pg/mg). Embora não havendo diferença significativa, o grupo EEA200 (13,06 pg/mg) também apresentou concentração elevada desta citocina pró-inflamatória, sendo o extrato que conferiu menor proteção neste caso (Figura 9).

No que diz respeito ao TNF- α a concentração foi semelhante entre os grupos ($p = 0,056$), com as seguintes médias: DNS (2,47 pg/mg), DHS (11,52 pg/mg), EEA200 (4,67 pg/mg), EEA400 (7,97 pg/mg), EAA200 (7,61 pg/mg) e EAA400 (10,56 pg/mg). Contudo, os grupos DHS e EAA400 apresentaram maior

concentração média de TNF- α se comparado aos demais que receberam dieta *high fat* (Figura 9).

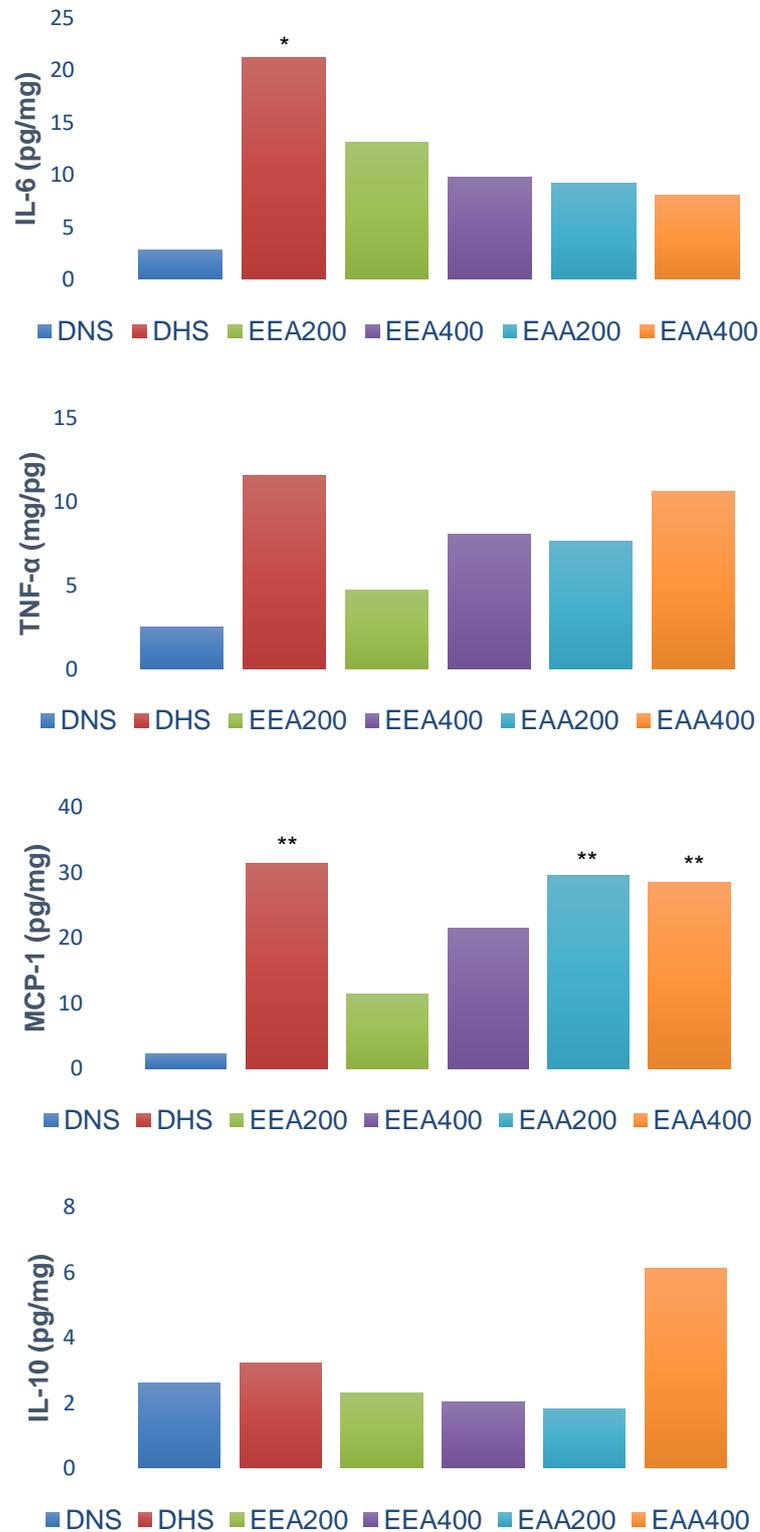
Estes resultados podem ser justificados pela relação entre o consumo de uma dieta hiperlipídica, rica em ácidos graxos saturados e os processos inflamatórios, já que os saturados ativam macrófagos M1 das células imunes, que por sua vez estimulam a secreção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 (CHAN *et al.*, 2015).

Vale lembrar que além de ações pró inflamatórias o TNF- α também induz resistência à insulina por reduzir a expressão do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) e do receptor de insulina IRS-1. Ainda, promove a lipólise e conseqüentemente o aumento da produção de ácidos graxos livres, como por exemplo, o VLDL (MARTINS *et al.*, 2014)

Em relação ao MCP-1 os resultados demonstram concentrações estatisticamente elevadas nos grupos DHS (31,36 pg/mg), EAA200 (29,48 pg/mg) e EAA400 (28,47 pg/mg) em comparação ao grupo DNS (2,20 pg/mg) (Figura 9).

Na concentração de IL-10, não se observou diferença significativa entre os grupos ($p=0,100$), com médias semelhantes entre si: DNS (2,61 pg/mg), DHS (3,22 pg/mg), EEA200 (2,30 pg/mg), EEA400 (1,93 pg/mg) e EAA200 (1,84 pg/mg); havendo valor relativamente maior no grupo EAA400 (6,07 pg/mg) (Figura 9). Devido à sua capacidade de minimizar a expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) de classe II e inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias por monócitos a IL-10 possui efeitos regulatórios importantes nas respostas imunológicas e inflamatórias (MALEFYT *et al.*, 1991).

Figura 9 - Dosagem das citocinas IL-6, TNF- α , MCP-1 e IL-10 no soro dos animais dos diferentes grupos experimentais.



Nota: animais controles (DNS – dieta padrão, DHS – dieta hiperlipídica) e tratados com extrato etanólico (EEA) e aquoso (EAA) de folhas da amoreira nas doses de 200 e 400 mg/kg. Os valores representam a média \pm erro padrão da média. * $p=0,026$ vs DNS. $p=0,056$. ** $p=0,004$ vs DNS. $p=0,100$. (¹Kruskal-wallis/ Dunn's, ²ANOVA).

Nossos achados indicam que o modelo de estudo demonstrou ser confiável para a análise das citocinas, por demonstrar concentrações elevadas das citocinas pró-inflamatórias no grupo que recebeu dieta hiperlipídica e baixas concentrações no grupo controle com dieta normal. Ainda, o EEA 400mg/kg conferiu maior proteção contra as citocinas pró-inflamatórias, apresentando comportamento mais próximo ao grupo controle.

Outros estudos com a *Morus nigra* demonstraram que esta espécie pode proporcionar benefícios à saúde através de efeitos anti-inflamatórios proporcionados por seus compostos. Os flavonoides totais (50 e 100 mg/kg) encontrados em frutas de *Morus nigra* demonstraram efeitos anti-inflamatórios, por meio de sua atividade antioxidante e inibição ou eliminação significativa das citocinas pró-inflamatórias, em especial o TNF- α (CHEN *et al.*, 2016).

Ainda, Chen *et al.* (2017) encontraram redução significativa dos níveis da citocina inflamatória IL-6, inibição da síntese de iNOS e aumento da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, por intermédio de constituintes ativos, antocianina cianidina-3-O-glicosídeo (C3G) e os flavonoides rutina (Ru) e isoquercetina (IQ), presentes no extrato de frutos de *Morus nigra*.

Os resultados observados neste estudo são importantes para elucidar, principalmente à população, os efeitos desta planta medicinal no controle da obesidade e suas comorbidades. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação envolvidos nos resultados encontrados, bem como realizar isolamento e identificar as frações e/ou compostos dos extratos que poderiam ser responsáveis por benefícios e ainda verificar se outras concentrações dos extratos etanólico e aquoso das folhas de amoreira seriam eficazes na prevenção ou controle das alterações metabólicas desencadeadas pela obesidade.

6 CONCLUSÃO

O EAA400 contribuiu para o aumento das concentrações plasmáticas de HDL-c e redução das concentrações plasmáticas de triglicerídeos e VLDL-c. Os extratos etanólico e aquoso da amoreira nas concentrações estudadas não foram capazes de atenuar o ganho de peso corporal, adiposidade e as concentrações de citocinas inflamatórias IL-6, TNF- α e MCP-1, desta forma, não se mostraram eficientes no combate à obesidade e suas alterações metabólicas.

REFERÊNCIAS

ALLAIN, C. C.; POON, L. S.; CHAN, C. S.; RICHMOND, W.; FU, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 470-475, 1974.

ALMEIDA, J. R. G. S.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; ARAÚJO, E. C. C.; SILVA, F. S.; NEVES, L. F.; OLIVEIRA, R. A.; SÁ, P. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Evaluation of hypoglycemic potential and pre-clinical toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p.96-100, 2011.

ALVARENGA, M.; SCAGLIUSI, F. B.; PHILIPPI, S. T. **Nutrição e transtornos alimentares: avaliação e tratamento**. 1 ed. Barueri, SP: Manole, 2011.

ARSLAN, N.; ERDUR, B.; AYDIN, A. Hormones and Cytokines in Childhood Obesity. **Indian Pediatrics**, v. 47, n. 10, p. 829-839, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA - ABESO. **Diretrizes brasileiras de obesidade 2016**. 4. ed. São Paulo, SP: Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica, 2016.

BARBALHO, S. M.; BECHARA, M. D.; QUESADA, K.; GABALDI, M. R.; GOULART, R. A.; TOFANO, R. J; GASPARINE, R. G. Síndrome metabólica, aterosclerose e inflamação: tríade indissociável? **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 14, n. 4, p. 319-327, 2015.

BERG, A. H.; COMBS, T. P.; SCHERER, P. E. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n. 2, p. 84-89, 2002.

BOURBON, M.; MIRANDA, N.; VICENTE, A. M.; RATO, Q. **Doenças cardiovasculares**. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Departamento de Promoção de Saúde e Prevenção de Doenças Não Transmissíveis. Republica Portuguesa, 2016, 24 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigitel Brasil 2017 Saúde Suplementar: **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 140 p.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA): Banco de dados. **Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>>. Acesso em: 28 jan. 2020.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2016. 190 p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise em Saúde e Vigilância de Doenças não Transmissíveis. **Vigitel Brasil 2018: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**: estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no Distrito Federal em 2018. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. 132 p.

BRAY, G. A. Medical Consequences of Obesity. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2583-2589, 2004.

BRAY, G. A.; GRAY, D. S. Obesity Part I – Pathogenesis. **Western Journal of Medicine**, v. 149, p. 429 -441, 1998.

BRUUN, J. M.; LIHN, A. S.; PEDERSEN, S. B.; RICHELSEN, B. Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 90, n. 4, p. 2282-2289, 2005.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! *Ciência hoje*, [S.l.], v. 21, n. 1.234, p. 26-30, 1997.

CALIXTO-LIMA, L.; GONZALEZ, M. C. **Nutrição clínica no dia a dia**. Rio de Janeiro: Rubio, 2013.

CASTELLO BRANCO, A. C. S.; DINIZ, M. F. F. M.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K. M.; RAMALHO, J. A.; DANTAS, J. G. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos *Wistar* e camundongos *Swiss* do biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011.

CASTRO, A. V. B.; KOLKA, C. M., KIM, S. P.; BERGMAN, R. N. Obesity, insulin resistance and comorbidities – mechanisms of association. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 6, p. 600-609, 2014.

CHAN, K. L.; PILLON, N. J.; SIVALOGANATHAN, D. M, COSTFORD, S. R.; LIU, Z.; THÉRET, M.; CHAZAUD, B.; KLIP, A. Palmitoleate reverses high fat-induced proinflammatory macrophage polarization via amp-activated protein kinase (AMPK). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 27, p. 16979-1698, 2015.

CHEN, F.; NAKASHIMA, N.; KIMURA, I.; KIMURA, M. Hypoglycemic activity and mechanisms of extracts from mulberry leaves (*Folium mori*) and cortex mori radices in streptozotocin-induced diabetic mice. **Yakugaku Zasshi**, v.115, n. 6, p.476-482, 1995.

CHEN, H.; PU, J.; LIU, D.; YU, W.; SHAO, Y.; YANG, G.; XIANG, Z.; HE, N. Anti-Inflammatory and antinociceptive properties of flavonoids from the fruits of black mulberry (*Morus nigra L.*). **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153080, 2016.

CHEN, H.; YU, W.; CHEN, G.; MENG, S.; XIANG, Z.; HE, N. Antinociceptive and antibacterial properties of anthocyanins and flavonols from fruits of black and non-black Mulberries. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 2-13, 2017.

CLEMENTE- POSTIGO, M.; QUEIPO-ORTUNO, M. I.; FERNANDEZ-GARCIA, D.; GOMEZ-HUELGAS, R.; TINAHONES, F. J.; CARDONA, F. Adipose tissue gene expression of factors related to lipid processing in obesity. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. e24783, 2011.

CUPPARI, L. **Guia de nutrição: nutrição clínica no adulto**. 2 ed. Barueri: Manole, 2005. 474 p.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 1380-1384, 2007.

FARIA, E. R.; FARIA, F. R.; FRANCESCHINI, S. C. C.; PELUZIO, M. C. G.; SANT'ANA, L. F. R.; NOVAES, J. F.; RIBEIRO, S. M. R.; RIBEIRO, A. Q.; PRIORE, S. E. Resistência à insulina e componentes da síndrome metabólica, análise por sexo e por fase da adolescência. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, n. 6, p. 610-618, 2014.

FAZIO, S.; BABAEV, V. R.; MURRAY, A. B.; HASTY, A. H.; CARTER, K. J.; GLEAVES, L. A.; ATKINSON, J. B.; LINTON, M. F. Increased atherosclerosis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 9, p. 4647-4652, 1997.

FLORENCE, N. T.; BENOIT, M. Z.; JONAS, K.; ALEXANDRA, T.; DÉSIÉ, D. D. P.; PIERRE, K.; THÉOPHILE, D. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 784-790, 2014.

FOSSATI, P.; PRINCIPE, L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. **Clinical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2077-2080, 1982.

FRIEDMAN, J. M.; HALAAS, J. L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature**, v. 395, n. 6704, p. 763-770, 1998.

GUIMARÃES, D. E. D.; SARDINHA, F. L. C.; MIZURINI, D. M.; CARMO, M. G. T. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Revista de Nutrição**, v. 20, n. 5, p. 549-559, 2007.

GUIZZO, P. L.; BREDDA, T. C. C.; SCARPA, M. V. C.; NAVARRO, F. F. Controle de qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, p. 259-265, 2015.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Metabolismo dos lipídios. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. (Org.). **Tratado de Fisiologia Médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. Cap. 68, p. 861-870.

HALES, C. M.; CARROLL, M. D.; FRYAR, C. D.; OGDEN, C. L. Prevalence of obesity among adults and youth: United States, 2015-2016. **NCHS Data Brief**, n. 288, p. 1-8, 2017.

HOSSEINZADEH, S.; JAFARIKUKHDAN, A.; HOSSEINI, A.; ARMAND, R. The application of Medicinal Plants in Tradicional and Modern Medicine: A Review of *Thymus vulgaris*. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 6, p. 635-642, 2015.

HWANG, S. H.; LI, H. M.; LIM, S. S.; WANG, Z.; HONG, J. S.; HUANG, B. Evaluation of a Standardized Extract from *Morus alba* against α -Glucosidase Inhibitory Effect and Postprandial Antihyperglycemic in Patients with Impaired Glucose Tolerance: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, ID 8983232, p. 1-10, 2016.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da saúde. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, 2010.

IMRAN, M.; KHAN, H.; SHAH, M.; KHAN, R.; KHAN, F. Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 11, n. 12, p. 973-80, 2010.

IQBAL, S.; YOUNAS, U.; SIRAJUDDIN; CHAN, K. W.; SARFRAZ, R. A.; UDDIN, MD. K. Proximate Composition and Antioxidant Potential of Leaves from Three Varieties of Mulberry (*Morus sp.*): A Comparative Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 6651-6664, 2012.

JIANG, Y.; DAI, M.; NIE, W. J.; YANG, X. R.; ZENG, X. C. Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra L.*) fruit on experimental atherosclerosis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 200, p. 228-235, 2017.

JIANG, Y.; NIE, W. J. Chemical properties in fruits of mulberry species from the Xinjiang province of China. **Food Chemistry**, v.174, p.460-466, 2015.

JIAO, Y.; WANG, X.; JIANG, X.; KONG, F.; WANG, S.; YAN, C. Antidiabetic effects of *Morus alba* fruit polysaccharides on high-fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 199, p. 119-127, 2017.

KIM, J. W.; KIM, S. U.; LEE, H. S. KIM, I.; AHN, M. Y.; RYU, K. S. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba L.* leaves by derivatization with 9- fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase highperformance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 1002, n. 1-2, p. 93-99, 2003.

KLEINBONGARD, P.; HEUSCH, G.; SCHULTZ, R. TNF alpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 127, n. 3, p. 295-314, 2010.

KLOP, B.; WOUTER JUKEMA, J.; RABELINK, T. J.; CASTRO CABEZAS, M. A. Physician's guide for the management of hypertriglyceridemia: the etiology of hypertriglyceridemia determines treatment strategy. **Panminerva Medica**, v. 54, n. 2, p. 91-103, 2012.

KRÓL, E.; JESZKA-SKOWRON, M.; KREJPCIO, Z.; FLACZYK, E.; WÓJCIAK, R. W. The Effects of Supplementary Mulberry Leaf (*Morus alba*) Extracts on the Trace Element Status (Fe, Zn and Cu) in Relation to Diabetes Management and Antioxidant Indices in Diabetic Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 174, n. 1, p. 158-165, 2016.

KUMAR, G.; KARTHIK, L.; RAO, K. V. B. Haemolytic activity of Indian medicinal plants toward human erythrocytes: an *in vitro* study. **Elixir Applied Botany**, v. 40, p. 5534-5537, 2011.

KUMAR, V.; CHAUHAN, S. Mulberry: Life enhancer. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 10, p. 271-278, 2008.

LEITE, L. D.; ROCHA, E. D. M.; BRANDÃO-NETO, J. Obesity: an inflammatory disease. **Revista Ciência e Saúde**, v. 2, n. 2, p. 85-95, 2009.

LENQUISTE, S. A.; MARINELI, R. S.; MORAES, E. A.; DIONÍSIO, A. P.; BRITO, E. S.; JUNIOR, M. R. M. Jaboticaba peel and jaboticaba peel aqueous extract shows *in vitro* and *in vivo* antioxidant properties in obesity model. **Food Research International**, v. 77, n. 2, p. 162-170, 2015.

LIMA, C. M.; LIMA, A. K.; MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; LEITE, B. L. S.; SERAFINI, M. R.; ALBURQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; ARAÚJO, A. A. S. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem *Wistar*) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, p. 1-9, 2014.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A. hippocratic screen for pure or crude drug materiais. **Lloydia**, v. 25, n. 4, p. 320-332, 1962.

MALEFYT, R. W.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G.; VRIES, J. E. Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 5, p. 1209-1220, 1991.

MALTA, D. C.; MOURA L. de; PRADO, R. R. do; ESCALNTE, J. C.; SCHMIDT, M. I., DUNCAN, B. B. Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 4, p. 599-608, 2014.

MARTINS, L. M.; OLIVEIRA, A. R. S.; CRUZ, K. J. C.; TORRES-LEAL, F. L.; MARREIRO, D. N. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p. 677-692, 2014.

MAURY, E.; BRICHARD, S. M. Adipokine dysregulation, adipose tissue inflammation and metabolic syndrome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 314, n. 1, p. 1-16, 2010.

MENA, P.; SÁNCHEZ-SALCEDO, E. M.; TASSOTI, M.; MARTÍNEZ, J. J.; HERNÁNDEZ, F.; DEL RIO, D. Phytochemical evaluation of eight white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry clones grown in Spain based on UHPLC-ESI-MSn metabolomic profiles. **Food Research International**, v. 89, n. 3, p. 1116-1122, 2016.

NAKAMURA, K.; FUSTER, J. J.; WALSH, K. Adipokines: a link between obesity and cardiovascular disease. **Journal of Cardiology**, v. 63, n. 4, p. 250-259, 2014.

NERY, C. S.; PINHEIRO, I. L.; MUNIZ, G. S.; VASCONCELOS, D. A. A.; FRANÇA, S. P.; NASCIMENTO, E. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 17, n. 1, p. 49-55, 2011.

NESAN D., Ng D. S. Revising the high-density lipoprotein targeting strategies- Insights from human and preclinical studies. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 51, n. 6, p. 321-331, 2014.

NOMURA, T. Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, v. 53, p. 87-201, 1988.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure**, OECD, Paris, 2008. 27p.

OLIVEIRA, A. C. B.; OLIVEIRA, A. P.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, R. A.; SILVA, F. S.; REIS, S. A. G. B.; RIBEIRO, L. A. A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 244-249, 2013.

OLIVEIRA, M. A. M. de; FAGUNDES, R. L. M.; MOREIRA, E. A. M.; TRINDADE, E. B. S. M.; CARVALHO, T. de. Relação de indicadores antropométricos com fatores de risco para doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 478-485, 2010.

OLIVEIRA, A. M.; MESQUITA, M. S.; SILVA, G. C.; LIMA, E. O.; MEDEIROS, P. L.; PAIVA, P. M. G.; SOUZA, I. A.; NAPOLEÃO, T. H. Evaluation of Toxicity and Antimicrobial Activity of an Ethanolic Extract from Leaves of *Morus alba* L. (Moraceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 115, p. 57-63, 2016b.

OLIVEIRA, A. M.; NASCIMENTO, M. F.; FERREIRA, M. R.; MOURA, D. F.; SOUZA, T. G.; SILVA, G. C.; RAMOS, E. H.; PAIVA, P. M.; MEDEIROS, P. L.; SILVA, T. G.; SOARES, L. A.; CHAGAS, C. A.; SOUZA, I. A.; NAPOLEÃO, T. H. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L. (Moraceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p.162-168, 2016a.

PASCOALE, A. Pharmacognosy: The oldest modern science. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 1984.

PATRÍCIO, P. R. **A expressão da proteína de transferência de colesterol éster (CETP) modula a adiposidade e a expressão de genes envolvidos em lipólise e lipogênese**. 2010. 113 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

PÉRUSSE, L.; CHAGNON, Y. C.; WEISNAGEL, J.; BOUCHARD, C. The human obesity gene map: the 1998 update. **Obesity Research**, v. 7, n. 1, p. 111-129, 1999.

PRADO, W. L. do; LOFRANO, M. C.; DÂMASO, A. R. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição do exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**. v. 15, n. 5, p. 378-383, 2009.

QUEIROZ, J. C. F.; ALONSO-VALE, M. I. C.; CURI, R.; LIMA F. B. Control of adipogenesis by fatty acids. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 582-594, 2009.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RODRIGUES, E. L.; MARCELINO, G.; SILVA, G. T.; FIGUEIREDO, P. S.; GARCEZ, W. S.; CORSINO, J.; GUIMARÃES, R. C. A.; FREITAS, K. C. Nutraceutical and medicinal potential of the *Morus* species in metabolic dysfunctions. **International Journal of molecular sciences**, v. 20, n. 301, p. 1-16, 2019.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 1, p. 85-91, 2006.

RUBIN, E. **Patologia: bases clínico-patológicas da medicina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SALERNO, P. S. V. **Efeito da dieta de cafeteria em ratos submetidos ao Estresse Crônico Variado: análise de parâmetros bioquímicos e comportamentais**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

SAMUEL, V. T.; SCHULMAN, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**, v. 148, p. 852-871, 2012.

SÁNCHEZ-SALCEDO, E. M.; AMORÓS, A.; HERNÁNDEZ, F.; MARTÍNEZ, J. J. Physicochemical Properties of White (*Morus alba*) and Black (*Morus nigra*) Mulberry Leaves, a New Food Supplement. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 5, n. 4, p. 253-261, 2017.

SÁNCHEZ-SALCEDO, E. M.; MENA, P.; GARCÍA-VIGUERA, C.; MARTÍNEZ, J. J.; HERNÁNDEZ, F. Phytochemical evaluation of white (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 399-408, 2015.

SANTOS, L. C.; TORRENT, I. F. O tecido adiposo e a produção de adipocinas. **Revista Digital. Faculdade de Pará de Minas**, v. 2, n. 2, p. 100-119, 2010.

SANTOS, S. H. S.; FERNANDES, L. R.; MARIO, E. G.; FERREIRA, A. V. M.; PÔRTO, L. C. J.; ALVAREZ-LEITE, J. I.; BOTION, L. M.; BADER, M.; ALENINA, N.; SANTOS, R. A. S. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. **Diabetes**, v. 57, n. 2, p. 340-347, 2008.

SCHWARTZ, G. J.; ASTARITA, G.; LI, X.; GAETANI, S.; CAMPOLONGO, P.; CUOMO, V.; PIOMELLI, D. The lipid messenger OEA links dietary fat intake to satiety. **Cell Metabolism**, v. 8, n. 4, p. 281-288, 2008.

SHEHZAD, A.; IQBAL, W.; SHEHZAD, O.; LEE, Y. S. Adiponectin: Regulation of its production and its role in human diseases. **Hormones**, v. 11, n. 1, p. 8-20, 2012.

SILVA JÚNIOR, I. I. da; BARBOSA H. M.; CARVALHO, D. C. R.; BARROS, R. A.; ALBUQUERQUE, F. P.; SILVA, D. H. A. da; SOUZA, G. R.; SOUZA, N. A. C.; ROLIM, L. A.; SILVA, F. M. M.; DUARTE, G. I. B. P.; ALMEIDA, J. R. G. S.; OLIVEIRA JÚNIOR, F. M. de; GOMES, D. A.; LIRA, E. C. Brazilian *Morus nigra* attenuated hyperglycemia, dyslipidemia and prooxidant status in Alloxan-induced diabetic rats. **The Scientific World Journal- Hindawi**, v. 2017, Article ID 5275813, p.10, 2017.

SILVA, N. A. O.; MORAIS, F. F. C. de; HELOU, T.; BERGAMIN, A. A. C.; TEIXEIRA, P. F. S.; VAISMAN, M. Níveis séricos de colesterol não HDL como marcador de risco cardiovascular em pacientes com hipotireoidismo subclínico. **Revista SOCERJ**, v. 22, n. 2, p. 80-85, 2009.

SILVA, S. M. C. S.; MURA, J. D. P. **Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2010.

SILVA, T. L.; ROCHA, R. A. R.; ALVES, L. C.; ROCHA, L. C. R.; FERREIRA, C. L. R.; RIBEIRO, M. N.; CUNHA, D. P. Efeito da ingestão de farinha de taioba sobre o peso corporal de ratos previamente alimentados com óleo de soja e banha suína. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 10, n. 2, p. 27-34, 2015.

SKINNER, A. C.; RAVANBAKHT, S. N.; SKELTON, J. A.; PERRIN, E. M.; ARMSTRONG, S. C. Prevalence of obesity and severe obesity in US children, 1999-2016. **Pediatrics**, v. 141, n. 3, p. 1-11, 2018.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2015-2016**. São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

SOUZA, G. R.; OLIVEIRA-JUNIOR, R. G.; DINIZ, T. C.; BRANCO, A.; LIMA-SARAIVA, S. R. G.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; PACHECO, A. G. M.; SILVA, M. G.; MORAES-FILHO, M. O.; COSTA, M. P.; PESSOA, C. Ó.; ALMEIDA, J. R. G. S. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 248-254, 2017.

TAG, H. M. Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, n. 252, p. 1-23, 2015.

THAIPITAKWONG, T.; NUMHOM, S.; ARAMWIT, P. Mulberry leaves and their potential effects against cardiometabolic risks: a review of chemical compositions, biological properties and clinical efficacy. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 109-118, 2018.

VOLP, A. C. P.; ALFENAS, R. C. G.; COSTA, N. M. B.; MINIM, V. P. R.; STRINGUETA, P. C.; BRESSAN, J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 3, p. 537-549, 2008.

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

WEISBERG, S. P.; HUNTER, D.; HUBER, R.; LEMIEUX, J.; SLAYMAKER, S.; VADDI, K.; CHARO, I.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE JR, A.W. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n. 5, p. 115-124, 2006.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p.1111-1119, 2005.

WHITE, P. A.; CERCATO, L. M.; BATISTA, V. S.; CAMARGO, E. A.; DE LUCCA W. JR.; OLIVEIRA, A. S.; SILVA, F. T.; GOES, T. C.; OLIVEIRA, E. R.; MORAES, V. R.; NOGUEIRA, P. C.; OLIVEIRA E SILVA, A. M.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; LIMA, B. S.; ARAÚJO, A. A.; SANTOS, M. R. Aqueous extract of *Chrysobalanus icaco* leaves, in lower doses, prevent fat gain in obese high-fat fed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179; p. 92-100, 2016.

WILSON, R. D.; ISLAM, M. D. S. Effects of white mulberry (*Morus Alba*) leaf tea investigated in a type 2 diabetes model of rats. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 72, n. 1, p. 153-160, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Global Health Observatory (GHO) data: Overweight and obesity**. 2017. Disponível em:

http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight_obesity/obesity_adults/en/.
Acesso em: 15 nov. 2017.

_____. **Obesity:** preventing and managing the global epidemic: Report of a WHO consultation. Geneva: 2000. 252p.

_____. **Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles.** Geneva: World Health Organization, 2018.

_____. Waist circumference and waist-hip ratio, 2008. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44583/9789241501491_eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 12/12/2019.

XU, J.; WANG, X.; CAO, K.; DONG, Z.; FENG, Z.; LIU, J. Combination of β -glucan and *Morus alba* L. Leaf Extract Promotes Metabolic Benefits in Mice Fed a High-Fat Diet. **Nutrients**, v. 9, n. 10, pii:E1110, 2017.

ZENI, A. L. B.; DALL'MOLIN, M. Hypotriglyceridemic effect of *Morus alba* L., Moraceae, leaves in hyperlipidemic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 130-133, 2010.

ZENI, A. L. B.; MOREIRA, T. D.; DALMAGRO, A. P.; CAMARGO, A.; BINI, L. A.; SIMIONATTO, E. L.; SCHARF, D. R. Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 2805-2815, 2017.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL- UFMS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



CI nº 48/2018 - CEUA/CPER/COMIS

Campo Grande, 27 de junho de 2018.

Da: Prof^a Dr^a Joice Stein - Coordenação da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFMS

Para: Biotério - UT /INBIO/ UFMS

Via: Direta

Assunto: Relação de Projetos Aprovados pela CEUA.

Prezada Senhora,

A Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMS informa que, em Reunião Ordinária de 21 de junho 2018, aprovou o Protocolo de Pesquisa, conforme relacionado abaixo:

Nº Protocolo	Título do Projeto e Nome do Pesquisador	Descrição da Espécie Animal	Nº Total de Animais	Início do experimento e término do projeto
953/2018	Efeitos dos extratos de folhas de amoreira (<i>Morus nigra</i> L.) em camundongos em uso de dieta hipercalórica. Pesquisadora responsável: Karine de Cassia Freitas Gielow	<i>Mus musculus</i> / Swiss, 30 a 35g / 12 semanas, 72 Machos + 15 Fêmeas	87	1º/09/2018 a 28/02/2020

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Joice Stein
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/UFMS

**ANEXO B - TESTE HIPOCRÁTICO: TOXICIDADE DE DROGAS POR ANÁLISE
COMPORTAMENTAL**

Teste de Toxicidade – Exemplo										
Droga: EEA Dose: 72 mg Volume da gavagem: 1 mL Hora da gavagem: 9:00h										
Data: 27/11/2018 Caixa: 02 Animal: 4 Peso: 36g Data de nascimento: 20/07/2018										
Sintomas	Normal	Tempo								
		0	30 m	1h	2h	3h	4h	6h	12h	24h
Aparência Normal	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Frênico vocal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Resposta ao toque	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Aperto da Cauda	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Contorção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trem posterior	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Endireitamento	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Tônus muscular	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Força de agarrar	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Reflexo corneal	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Tremores	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Estimulações	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Straub	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micção	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Piloereção	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defecação	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Hipotermia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Respiração	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Cianose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morte										

Notas:

- Teste com anotação normal “0”, a intensidade do efeito varia na escala de 1 à 4.
- Teste com anotação normal “4”, a intensidade do efeito poderá variar de 0 à 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 à 8 quando ocorrer aumento.

Fonte: Adaptado (MALONE; ROBICHAUD, 1962)