

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANGELA MARIA MARTINS

**EFEITOS DA MACA VERMELHA (*Lepidium meyenii Walp.*) SOBRE VARIÁVEIS
METABÓLICAS, COMPORTAMENTAIS E SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL
DE RATAS WISTAR OVARIECTOMIZADAS**

ALFENAS/MG

2025

ANGELA MARIA MARTINS

EFEITOS DA MACA VERMELHA (*Lepidium meyenii* Walp.) SOBRE VARIÁVEIS METABÓLICAS, COMPORTAMENTAIS E SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL DE RATAS WISTAR OVARIECTOMIZADAS

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Neuroendocrinologia básica e aplicada

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia Graciela Ruginsk Leitão.

ALFENAS/MG

2025

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Martins, Angela Maria.

Efeitos da maca vermelha (*Lepidium meyenii* Walp.) sobre variáveis metabólicas, comportamentais e sobre a microbiota intestinal de ratas wistar ovariectomizadas / Angela Maria Martins. - Alfenas, MG, 2025.
96 f. : il. -

Orientador(a): Sílvia Graciela Ruginsk Leitão.

Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. *Lepidium meyenii* Walp. 2. Ratas ovariectomizadas. 3. Função gonadal. 4. Microbiota intestinal. 5. Dislipidemia. I. Leitão, Sílvia Graciela Ruginsk, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

ANGELA MARIA MARTINS

EFEITOS DA MACA VERMELHA (*Lepidium meyenii* Walp.) SOBRE VARIÁVEIS METABÓLICAS, COMPORTAMENTAIS E SOBRE A MICROBIOTA INTESTINAL DE RATAS WISTAR OVARIECTOMIZADAS

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biociências Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 28 de Abril de 2025.

Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Profa. Dra. Hudsara Aparecida de Almeida Paula
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Profa. Dra. Marília Gabriella Alves Goulart Pereira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Profa. Dra. Carla Speroni Ceron
Instituição: Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP)

Prof. Dr. Wesley Fernandes Fonseca
Instituição: Instituto Agostiniano de Filosofia



Documento assinado eletronicamente por **Silvia Graciela Ruginsk Leitão, Presidente**, em 30/04/2025, às 11:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1482444** e o código CRC **6455AC47**.

Ao meu pai Paulo, à minha
mãe Marlene e ao meu irmão
Adriano, que nunca me
deixaram desistir, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nunca me desamparou.

À minha orientadora Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão, pelo apoio, incentivo e pelos valiosos ensinamentos.

À minha família, pela compreensão e suporte.

À toda equipe de trabalho, pela parceria.

Aos Professores e à toda equipe do Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, da Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade de aprendizado profissional e crescimento pessoal.

Aos Professores Dr. Leandro de Almeida e Dra. Olga Tavano, pelo direcionamento e suporte nas análises.

À Universidade Federal de Alfenas, especialmente à toda equipe do Laboratório de Fisiologia, pelo apoio na realização do trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições dadas a este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

RESUMO

A Maca tem sido amplamente utilizada na medicina complementar para tratar infertilidade, redução da libido e outros sintomas associados à menopausa. O presente estudo explorou a influência da suplementação oral com Maca Vermelha em indicadores comportamentais, metabólicos e bioquímicos associados ao hipoestrogenismo. Após aclimatação, ratas Wistar adultas foram submetidas à ovariectomia (OVX) ou cirurgia simulada (SHAM). Os animais foram então tratados por gavagem com uma suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias. Ao final do tratamento, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto e eutanasiados para coleta do útero, hipófise, adeno-hipófise, timo, tecidos adiposos branco e marrom e do plasma para as análises de glicemia casual, colesterol total, triglicérides, lactato e cálcio. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UNIFAL/MG (protocolo 005/2022). Tanto a OVX quanto a administração da Maca Vermelha não alteraram a glicemia casual, o perfil lipídico plasmático e as concentrações de cálcio. Além disso, o tratamento com Maca Vermelha não modificou as alterações induzidas por OVX na massa corporal, índice uterino ou tamanho relativo do tecido adiposo marrom. No entanto, a Maca Vermelha preveniu a diminuição induzida pela OVX na massa relativa da hipófise, indicando um papel potencial no controle central da função gonadal. A administração de Maca Vermelha induziu ainda a um efeito ansiolítico em animais OVX, mas não em animais SHAM, o que ocorreu em paralelo com alterações do perfil da microbiota intestinal. A análise da composição da Maca Vermelha revelou quantidades significativas de flavonoides, que podem estar subjacentes à importante atividade antioxidante, conforme demonstrado por ensaios de eliminação de radicais *in vitro*. Portanto, a Maca Vermelha pode ser considerada um alimento funcional em potencial para gerenciar alterações associadas ao hipoestrogenismo, particularmente no comportamento e na saúde intestinal. No entanto, o uso mais prolongado deve ser avaliado por estudos futuros, a fim de validar os efeitos benéficos da Maca Vermelha em marcadores metabólicos, comportamentais e bioquímicos.

Palavras-chave: *Lepidium meyenii* Walp; Ratas ovariectomizadas; Função gonadal; Microbiota intestinal; Dislipidemia; Ansiedade.

ABSTRACT

Maca has been widely used in complementary medicine to treat infertility, reduced libido, and other symptoms associated with menopause. The present study explored the influence of oral supplementation with Red Maca on behavioral, metabolic, and biochemical indicators associated with hypoestrogenism. After acclimatization, adult Wistar rats underwent ovariectomy (OVX) or sham surgery (SHAM). The animals were then treated by gavage with a suspension of Red Maca (100 mg/kg/day) for 21 days. At the end of the treatment, the animals were subjected to the open field test and euthanized for collection of the uterus, pituitary, adenohypophysis, thymus, white and brown adipose tissues, and plasma for analysis of casual blood glucose, total cholesterol, triglycerides, lactate, and calcium. All procedures were approved by the Animal Research Ethics Committee of UNIFAL/MG (protocol 005/2022). Neither OVX nor Red Maca administration altered random blood glucose, plasma lipid profile, or calcium concentrations. Furthermore, Red Maca treatment did not modify OVX-induced changes in body mass, uterine index, or relative brown adipose tissue size. However, Red Maca prevented the OVX-induced decrease in relative pituitary mass, indicating a potential role in the central control of gonadal function. Red Maca administration also induced an anxiolytic effect in OVX animals, but not in SHAM animals, which occurred in parallel with changes in the gut microbiota profile. Analysis of the composition of Red Maca revealed significant amounts of flavonoids, which may underlie the important antioxidant activity, as demonstrated by in vitro radical scavenging assays. Therefore, Red Maca can be considered a potential functional food to manage changes associated with hypoestrogenism, particularly in behavior and gut health. However, longer use should be evaluated by future studies in order to validate the beneficial effects of Red Maca on metabolic, behavioral and biochemical markers.

Keywords: *Lepidium meyenii* Walp; Ovariectomized rats; Gonadal function; Gut microbiota; Dyslipidemia; Anxiety.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Delta da massa corporal (g), em animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100mg/kg/dia) por 21 dias.....	34
Figura 2 -	Massas relativas (mg/100g de peso corporal) do útero (A), hipófise (B) e adeno-hipófise (C) em animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias.....	35
Figura 3 -	Variação da massa relativa do tecido adiposo branco (g/100 g de m.c.), massa relativa do tecido adiposo marrom (mg/100 g de m.c.), massa relativa do timo (mg/100 g de m.c.) em animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias.....	37
Figura 4 -	Concentrações plasmáticas de triglicérides (A), colesterol total (B) e glicemia casual (C) em animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias.....	39
Figura 5 -	Concentrações plasmáticas de lactato (A) e cálcio total (B) em animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias.....	40
Figura 6 -	DNA bacteriano total (em $2^{-\Delta Ct}$, 6A), DNA de Bacteroidetes (em $2^{-\Delta Ct}$ 6B), DNA de Firmicutes (em $2^{-\Delta Ct}$ 6C) e DNA de Gammabacteria (em $2^{-\Delta Ct}$ 6D) em amostras fecais obtidas de animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias.....	41
Figura 7 -	Tempo de permanência no centro (em segundos, 7A), tempo de permanência na periferia (em segundos, 7B), tempo de mobilidade (em segundos, 7C) e tempo de imobilidade (em segundos, 7D) em animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias e submetidos ao teste de campo aberto.....	43
Fotografia 1 -	Amostras desidratadas de Maca Amarela, Vermelha e Preta (da esquerda para a direita).....	23
Fotografia 2 -	Tratamento com Maca Vermelha via gavagem.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição centesimal da Maca Vermelha.....	32
Tabela 2 -	Composição de fenólicos totais da Maca Vermelha.....	32
Tabela 3 -	Composição de flavonoides totais da Maca Vermelha.....	33
Tabela 4 -	Potencial antioxidante da Maca Vermelha, pela captura do radical DPPH e ABTS ⁺	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	ESTEROIDES SEXUAIS FEMININOS E O EIXO GONADAL.....	14
2.2	MENOPAUSA.....	15
2.2.1	Alterações metabólicas na menopausa.....	16
2.2.2	Efeitos da menopausa em tecidos-alvo da função estrogênica.....	17
2.2.3	A microbiota intestinal e sua relação com a saúde mental.....	18
2.3	ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	21
2.3.1	Maca.....	21
3	OBJETIVOS.....	24
4	JUSTIFICATIVA.....	25
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MACA VERMELHA.....	26
5.1.1	Extrato metanólico.....	26
5.2	DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	26
5.3	DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS.....	27
5.4	DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE PELA CAPTURA DO RADICAL DPPH E ABTS ⁺	27
5.5	ANIMAIS.....	27
5.5.1	Cirurgia de ovariectomia bilateral.....	29
5.6	ANÁLISES PLASMÁTICAS.....	29
5.7	ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL POR PCR EM TEMPO REAL.....	29
5.8	AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO EM CAMPO ABERTO.....	30
5.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	31
6	RESULTADOS.....	32
6.1	COMPONENTES DA MACA VERMELHA.....	32
6.1.1	Composição centesimal da Maca Vermelha.....	32
6.1.2	Composição de fenólicos totais da Maca Vermelha.....	32
6.1.3	Composição de flavonoides totais da Maca Vermelha.....	33
6.1.4	Determinação do potencial antioxidante pela captura do radical	

	DPPH e ABTS ⁺	33
6.2	EFEITOS DO TRATAMENTO COM A MACA VERMELHA SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS.....	33
6.2.1	Evolução Ponderal dos animais.....	33
6.2.2	Massa relativa de tecidos endócrinos e tecidos-alvo da função estrogênica.....	34
6.2.3	Análises plasmáticas.....	38
6.3	MICROBIOTA INTESTINAL.....	40
6.4	ANÁLISE DO COMPORTAMENTO EM CAMPO ABERTO.....	42
7	DISCUSSÃO	44
8	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	APÊNDICE A	61
	ANEXO A	96

1 INTRODUÇÃO

A menopausa começa após doze meses do último ciclo menstrual e representa um marco importante para a saúde da mulher. A transição hormonal, que caracteriza o período do climatério, está associada ao aumento da massa adiposa, resistência à insulina, dislipidemia e disfunção endotelial (Nappi *et al.*, 2022), como resultado da produção progressivamente reduzida de estrogênio e progesterona pelos ovários (Paciuc, 2020).

Estudos recentes sugerem que alterações metabólicas devido à depleção de estrogênio após a menopausa levam a um risco cardiovascular aumentado (Kim *et al.*, 2020), que pode ser agravado por um estilo de vida sedentário (Dąbrowska-Galas *et al.*, 2019). Além disso, o hipoestrogenismo está associado a mudanças anatômicas e fisiológicas, que comprometem o assoalho pélvico e os esfíncteres, podendo explicar uma maior prevalência de constipação intestinal em mulheres no período pós-menopausa (Dantas *et al.*, 2020). Manifestações de ordem psicológica, redução do desempenho sexual, irritabilidade, alterações do humor, e distúrbios do sono podem também estar presentes (Callan *et al.*, 2018).

O crescimento da população idosa no Brasil tem ocorrido de forma acelerada e, a expectativa de vida da população feminina é maior em relação à masculina, com isso, mais mulheres vão experimentar cada vez mais mudanças relacionadas ao climatério e à menopausa, razão pela qual essa fase da vida merece maior atenção no âmbito da saúde pública e da busca por tratamentos alternativos (Gonçalves *et al.*, 2016), uma vez que a reposição hormonal com estrogênio tem inúmeras contraindicações.

A Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) é uma erva crucífera nativa da América do Sul, que cresce exclusivamente acima de 3.500 m nos Andes centrais. É rica em fibras, nutrientes essenciais e compostos bioativos, como isoflavonas, quercetina e antocianinas (Santos *et al.*, 2021). Estudos utilizando Maca em ratas ovariectomizadas (OVX) verificaram melhora da massa óssea e restauração do tecido ósseo trabecular das vértebras lombares (Zhang *et al.*, 2006), aumento dose-dependente dos níveis de Interferon Gama (IFN- γ), favorecendo a imunidade inata (Leiva-Revilla *et al.*, 2014) e atividade antidepressiva (Rubio *et al.*, 2006).

Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo elucidar o efeito da Maca Vermelha sobre parâmetros metabólicos, comportamentais e sobre o perfil

de microbiota intestinal de ratas OVX, utilizadas amplamente na literatura para mimetizar os efeitos sistêmicos e centrais do hipoestrogenismo associado à menopausa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTEROIDES SEXUAIS FEMININOS E O EIXO GONADAL

O grupo de hormônios esteroides secretados principalmente pelo ovário e, em menor quantidade, pelas adrenais, é denominado estrogênio, e engloba três hormônios estruturalmente semelhantes: estrona, estriol e 17β -estradiol, sendo o último o principal esteroide em humanos, uma vez que é a forma prevalente durante a maior parte da vida reprodutiva (National Academies of Sciences *et al.*, 2020).

Os hormônios ovarianos regulam a secreção dos demais hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas por meio de um clássico controle de retroalimentação negativa. Durante a ativação do eixo, ocorre a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo, sendo o mesmo transportado para a adeno-hipófise por meio do sistema porta hipotalâmico-hipofisário. Lá, o GnRH estimula os gonadotrofos a secretarem o hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), os quais estimulam a síntese e secreção de 17β -estradiol pelos ovários (Gingold; Jain; Jalai, 2022). O estradiol, por sua vez, inibe a liberação adicional de LH e FSH, bem como a frequência dos pulsos de GnRH no hipotálamo. Apenas no momento pré-ovulatório essa relação se inverte, passando a constituir uma retroalimentação positiva (Guyton; Hall, 2006).

Com o avanço da idade, o sistema de *feedback* sofre alterações graduais, e, com a menopausa, a depleção dos folículos ovarianos é acompanhada pela diminuição drástica da produção de 17β -estradiol e progesterona, subsequentemente aumentando a secreção de FSH e LH (Amarya; Singh; Sabharwal, 2018). No sexo feminino, a função do FSH é regular o crescimento folicular e a produção crescente de estradiol pelas células da granulosa, já o LH é responsável por aumentar a captação de colesterol e estimular as células intersticiais da teca dos folículos ovarianos a secretar androstenediona e testosterona (Orlowski; Sarao, 2023).

A ovariectomia em ratas, desde a década de 1980, é conhecida por acelerar o ganho de massa corpórea, especialmente tecido adiposo. Algumas das possibilidades que poderiam explicar esse fato, são a relação entre a deficiência de estrogênio e a diminuição de receptores de leptina no hipotálamo, reduzindo a

sensação de saciedade (Kimura *et al.*, 2002), e a diminuição do gasto energético provocado pela deficiência de estrogênio (Richard, 1986). Dessa forma, a OVX tem sido amplamente utilizada na literatura como um modelo *in vivo* para mimetizar as manifestações da pós-menopausa (Gallo *et al.*, 2008).

2.2 MENOPAUSA

A menopausa é o período que se segue ao último ciclo menstrual, caracterizando o final do climatério, fase que compreende a transição entre o período reprodutivo e o não reprodutivo da vida da mulher. Nesta fase, ocorre queda progressiva de produção dos hormônios estrogênio e progesterona pelos ovários (Habeeb, 2024).

Estudos da literatura relacionam a idade de ocorrência da menopausa a taxas de mortalidade. Em mulheres com idade mais avançada de início da menopausa, a mortalidade está normalmente relacionada a neoplasias malignas ginecológicas hormônio-dependentes (Wu *et al.*, 2014); entre aquelas em que a menopausa ocorre mais precocemente, a mortalidade é decorrente de alguma causa específica, como as doenças cardiovasculares (Li *et al.*, 2013). Uma possível explicação para a relação entre mortalidade cardiovascular e menopausa seria o aumento do estresse oxidativo e a deterioração precoce de células vasculares endoteliais, células de músculo liso e do miocárdio, que expressam receptores sensíveis a estrogênio (Mondul *et al.*, 2005).

A redução dos níveis de estrogênio decorrente da transição menopausal também tem sido apontada como a principal responsável pelas dislipidemias, as quais também aumentam indiretamente o risco cardiovascular (Camon; Garratt; Correa, 2024). Além disso, na menopausa há maior incidência de obesidade, sintomas vasomotores, urogenitais e psicológicos, redução do desempenho sexual (Sutton-Tyrrell *et al.*, 2010), fogacho, sudorese noturna, secura da pele, secura vaginal, irritabilidade, alterações do humor, modificação na sexualidade, osteoporose, e distúrbios do sono (Chang; Lewis; Wertz, 2023). No entanto, a reposição hormonal com estrogênio nem sempre é indicada, devido a seus potenciais efeitos colaterais e contraindicações (Mehta; Kling; Manson, 2021).

Os sinais e sintomas gastrointestinais também são comuns durante e após a menopausa. Um estudo realizado com 60 mulheres saudáveis na pós-menopausa

avaliou a associação da composição e diversidade do microbioma fecal com níveis urinários de estrogênios e seus metabólitos. Os resultados obtidos apoiaram a hipótese de que diferenças no metabolismo e nos níveis de estrogênio estão associadas à menor diversidade microbiana intestinal (Fuhrman *et al.*, 2014).

Como o crescimento da população idosa tem ocorrido de forma acelerada e, a expectativa de vida da população feminina é maior em relação à masculina, mais mulheres vão experimentar mudanças relacionadas ao climatério e à menopausa, razão pela qual essa fase da vida merece maior atenção no âmbito da saúde pública e da busca por tratamentos alternativos (Delanerolle *et al.*, 2025).

2.2.1 Alterações metabólicas na menopausa

Na menopausa, muitas mulheres experimentam mudanças no peso e na composição corporal, sendo a região abdominal a mais comprometida, aumentando os riscos cardiovascular e metabólico em longo prazo (Fenton, 2021). Além disso, foi demonstrado que o volume de gordura visceral aumenta à medida que os níveis de estrogênio diminuem durante a menopausa, o que pode comprometer ainda mais a saúde cardiovascular nesta fase da vida (El Khoudary *et al.*, 2015).

A circunferência da cintura costuma aumentar significativamente durante essa transição, e mudanças semelhantes são vistas em uma variedade de grupos étnicos. A redução dos níveis de estrogênio, que parece ser um gatilho importante para essas mudanças, também altera o gasto energético total e em repouso (Gavin *et al.*, 2018). Os níveis de FSH apresentam aumento na menopausa, o que parece ter um efeito independente na regulação da homeostase energética. Isso explica porque o uso da terapia de reposição de estrogênio, que não suprime completamente os níveis de FSH, pode falhar em prevenir completamente as alterações de gordura na menopausa (Kohrt; Wierman, 2017).

O sono também é afetado negativamente pela menopausa, que pode ocorrer devido ao rubor e suor noturnos, despertar aleatório nas primeiras horas da manhã ou apneia obstrutiva do sono. A privação do sono está associada à fadiga e a níveis mais baixos de atividade física, o que leva à uma associação clara também ao maior ganho de peso na menopausa (Patel *et al.*, 2006).

Uma revisão considerando a modificação de padrões alimentares demonstrou que mulheres foram capazes perder e manter o peso durante a transição da

menopausa após sessões nutricionais individuais ou em grupo, promovendo uma redução na ingestão de gordura e um aumento no consumo de frutas, vegetais e grãos integrais, bem como a adoção dos princípios da dieta mediterrânea (Pugliese *et al.*, 2020).

Em adição ao risco metabólico, o risco cardiovascular associado à menopausa é amplamente atribuído à mudança para um perfil lipídico aterogênico, caracterizado por um aumento nas concentrações de colesterol total (CT), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos (TG) e uma diminuição na concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (El Khoudary, 2017). Essas alterações no perfil lipídico parecem ser independentes da idade, do índice de massa corporal (IMC) e do tempo desde o último período menstrual (Anagnostis *et al.*, 2020). Isso porque os estrogênios exercem um papel protetor no sistema cardiovascular e são produzidos principalmente nos ovários por meio de um processo que usa o LDL como substrato. Entretanto, o LDL circulatório não é utilizado para sintetizar estrogênio durante a menopausa, resultando assim na diminuição da produção de estrogênio e no aumento da disponibilidade sistêmica do substrato, levando ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (Thaung Zaw; Howe; Wong, 2018).

Em geral, os estrogênios exógenos exercem um efeito benéfico sobre o perfil lipídico, refletido na diminuição do CT, do LDL e no aumento das concentrações de HDL (Salpeter *et al.*, 2006). Em paralelo, a adoção de uma dieta saudável envolvendo alto consumo de peixes, algas marinhas, laticínios com baixo teor de gorduras, cereais integrais, vegetais frescos, frutas e baixo consumo de *fast foods*, alimentos ricos em gordura animal, doces e frituras, demonstra ter um efeito protetor contra a desregulação do metabolismo lipídico entre mulheres na pós menopausa (Woo; Shin; Kim, 2014). Além do mais, recomenda-se que mulheres na pós-menopausa aumentem sua ingestão de antioxidantes exógenos, como vitaminas, flavonoides e isoflavonas, nutrientes encontrados em frutas, vegetais, soja, cacau e extratos naturais (Hwang *et al.*, 2019).

2.2.2 Efeitos da menopausa em tecidos-alvo da função estrogênica

Quando os ovários de uma mulher adulta são removidos, os órgãos sexuais regredem até certo ponto, de maneira que o útero se torna quase infantil em

tamanho, a vagina fica menor e o epitélio vaginal torna-se fino e mais susceptível a lesões. As mesmas mudanças tendem a ocorrer na mulher depois da menopausa, uma vez que o estrógeno é responsável por estimular as glândulas do endométrio (Guyton; Hall, 2006). O declínio da função ovariana com a menopausa está associado a aumentos espontâneos de citocinas pró-inflamatórias, incluindo Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 6 (IL-6) e Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Os mecanismos moleculares precisos pelos quais o estrogênio interfere na atividade das citocinas ainda não estão esclarecidos, mas podem incluir interações do retículo endoplasmático com fatores de transcrição, modulação da atividade do óxido nítrico, efeitos antioxidantes, ações da membrana plasmática e alterações na função das células imunes (Zhou *et al.*, 2016). Durante a transição da menopausa, há também uma redução progressiva na sensibilidade da hipófise ao estradiol (Perlman *et al.*, 2018).

Além do mais, a distribuição visceral dos adipócitos está relacionada ao aumento da inflamação, um gatilho importante para doenças cardiovasculares e metabólicas, conforme já discutido. O tecido adiposo branco (TAB) é considerado um órgão endócrino, capaz de produzir muitas adipocinas e substâncias que estão associadas à resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) e síndrome metabólica (Fenton, 2021). Um estudo investigando a associação entre adipocinas séricas e os níveis séricos de estrogênio em mulheres saudáveis na pré- e pós-menopausa verificou que os níveis de TNF- α foram significativamente maiores após a menopausa, sugerindo que a deficiência de estrogênio resulta no aumento da inflamação sistêmica, o que pode contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose e DM-2 (Hong *et al.*, 2007).

2.2.3 A microbiota intestinal e sua relação com a saúde mental

O microbioma intestinal é predominantemente composto por Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Proteobacteria. Quando há um desequilíbrio de qualquer um desses filos de bactérias, pode ocorrer a disbiose, em que a abundância de bactérias desejáveis leva ao aumento do pH promovendo sintomas desconfortáveis de gases, inchaço e/ou diarreia. Na disbiose, a abundância de bactérias prejudiciais também pode aumentar, reduzindo as bactérias desejáveis e a variedade de micro-organismos presentes

(Alagiakrishnan; Morgadinho; Halverson, 2024). Já é bem sabido que, em indivíduos idosos, a composição da microbiota apresenta naturalmente uma diversidade reduzida, com predominância de Proteobacteria e diminuição de Bifidobacterium (Biagi *et al.*, 2010).

Outro conceito importante dentro deste contexto é o de estroboloma, que é o nome dado ao agregado de genes bacterianos entéricos cujos produtos são capazes de metabolizar estrogênios (Hu *et al.*, 2023). Há também uma relação entre a riqueza microbiana intestinal, estrogênios sistêmicos e fecais, e a atividade da β -glucuronidase, que é uma enzima hidrolítica envolvida na desconjugação de estrogênios, em mulheres saudáveis na pós-menopausa (Flores *et al.*, 2012). O impacto da menopausa nos hormônios intestinais, como leptina, grelina e adiponectina, que regulam a saciedade, é especulado, porém permanece desconhecido (Rettberg; Yao; Brinton, 2014). Porém, já foi demonstrado em modelos animais que o microbioma intestinal se altera em resposta à OVX, e que isso está associado a mudanças significativas na saúde metabólica.

Sabe-se que a microbiota intestinal está envolvida na homeostase energética, extraindo energia dos alimentos por meio de processos de fermentação e formação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) (Magne *et al.*, 2020). Ela também aumenta a vascularização das vilosidades, levando à melhor absorção de nutrientes e diminuição dos níveis de quinase ativada por AMP cíclico (AMPK) e β -oxidação no tecido muscular. Além disso, a microbiota modula a inibição da liberação do fator adiposo induzido pelo jejum (FIAF), um inibidor da atividade da lipoproteína lipase (LPL), resultando no armazenamento subsequente de triglicerídeos no tecido adiposo e no fígado (Bäckhed *et al.*, 2004). A microbiota também influencia o desenvolvimento de endotoxemia metabólica e inflamação de baixo grau, que pode ocorrer devido à exposição crônica ao lipopolissacarídeo (LPS), uma molécula pró-inflamatória derivada de bactérias Gram-negativas, que passaria do lúmen intestinal para a corrente sanguínea (Magne *et al.*, 2020).

A atividade endotóxica do LPS das bactérias pertencentes ao filo Bacteroidetes parece ser menor do que a de outras bactérias Gram-negativas, como aquelas pertencentes ao filo Proteobacteria. Curiosamente, aumentos de Proteobacteria também foram observados em indivíduos ou animais obesos, e a administração de Enterobacter, um membro do filo Proteobacteria em camundongos livres de germes resultou no desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina

(Fei; Zhao, 2013). Sobre a produção de AGCC, Bacteroidetes produzem principalmente acetato e propionato, enquanto Firmicutes produzem mais butirato, que é considerado uma molécula promotora da saúde devido à sua capacidade de aumentar a sensibilidade à insulina, exercer atividades anti-inflamatórias, regular o metabolismo energético e aumentar a expressão do gene da leptina (Magne *et al.*, 2020).

Assim, parece que o microbioma tem um papel fundamental na regulação do metabolismo do estrogênio e qualquer interação pode ser bidirecional. Explorar essa relação em mulheres na menopausa também pode fornecer novos caminhos para intervenção terapêutica (Becker; Manson, 2020), também considerando-se o impacto dessa relação na saúde mental, por meio do eixo intestino-cérebro.

Nesse contexto, sabe-se que o transtorno depressivo maior afeta aproximadamente 6 % da população global a cada ano. É duas vezes mais frequente em mulheres do que homens, e mudanças nos hormônios esteroides sexuais endógenos são indicados como um fator contribuinte (Santoro *et al.*, 2021). Mulheres com histórico prévio de transtorno depressivo maior são mais susceptíveis à recorrência durante a transição da menopausa (Brown *et al.*, 2024).

Os transtornos de ansiedade também têm uma grande relevância no contexto atual de saúde mental. O termo ansiedade é frequentemente usado para descrever uma ampla gama de sintomas, incluindo aqueles associados a transtornos de ansiedade, como transtorno do pânico ou ansiedade generalizada e sintomas físicos associados, como falta de ar, taquicardia e tensão. Alguns desses sintomas podem ser semelhantes a manifestações da menopausa, que são prevalentes no processo de envelhecimento, sendo, portanto, difícil de distinguir (Tripathi, 2022). Um estudo realizado na China encontrou uma relação longitudinal bidirecional entre sintomas de ansiedade e o incômodo devido aos sintomas vasomotores da menopausa, sugerindo que a ansiedade pode ser tanto uma causa quanto uma consequência das alterações autonômicas (Tang *et al.*, 2020).

A diminuição de estrogênio e progesterona e mudanças nas suas proporções durante a transição da menopausa estão associados a distúrbios do sono, como insônia, privação do sono, sonolência diurna excessiva, apneia obstrutiva do sono, síndrome das pernas inquietas, depressão, distúrbios de humor e ansiedade, que resultam em sintomas físicos e psicológicos deletérios (Jehan *et al.*, 2015). A má qualidade do sono também está associada à prejuízos à qualidade de vida e ao

aumento da ingestão de energia, de alimentos ricos em gordura e açúcar, diminuição da atividade física, ganho de peso e risco de obesidade (Kravitz; Kazlauskaitė; Joffe, 2018).

2.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS

A segurança e os benefícios da terapia de reposição hormonal (TRH) em mulheres na pós-menopausa tem sido debatido devido às descobertas em ensaios clínicos demonstrando associação com riscos à saúde, principalmente cardiovascular e com o aumento da incidência de câncer de mama (Delgobo *et al.*, 2019), evidenciando a importância da busca por tratamentos alternativos.

Neste contexto, alimentos funcionais são aqueles que possuem compostos bioativos capazes de apresentar efeitos benéficos à saúde, além de seu valor nutricional básico (Lionetti *et al.*, 2019). O conceito de alimentos funcionais foi iniciado e regulamentado pelo Ministério da Saúde e Bem-Estar do Japão, na década de 1980 e depois progrediu para a América do Norte e outros mercados (Essa *et al.*, 2021).

Alimentos de origem vegetal são uma rica fonte de antioxidantes naturais que ajudam a fortalecer a imunidade inata e protegem dos efeitos tóxicos dos oxidantes. Os polifenóis são compostos bioativos presentes nesses alimentos e apontados como os principais responsáveis pela ação antioxidante, além de atividades antialérgicas, antimutagênicas (Alshatwi *et al.*, 2010) e neuroprotetoras (Yu *et al.*, 2017). Muitos alimentos são reconhecidos como funcionais por conterem esses polifenóis e/ou outros compostos bioativos, como: tomate, brócolis, soja, espinafre, mirtilo, romã, uva, manga, amêndoa, noz, peixes, probióticos, entre outros, e que já foram associados aos mais diversos efeitos à saúde (Essa *et al.*, 2021).

A ingestão alimentar de mulheres na pós-menopausa demonstrou estar associada à gravidade de sintomas psicológicos, somáticos, vasomotores e distúrbios do sono (Meegaswatte *et al.*, 2024), comprovando a importância da alimentação nesse processo.

2.3.1 Maca

A primeira descrição taxonômica da espécie *Lepidium meyenii* Walp., foi

realizada em 1843, proveniente de dados coletados em um lugarejo chamado Meyeni, do Departamento de Puno, Peru (Zhang; Zhang, 2020). Essa planta pertence à família *Brassicaceae*, sendo conhecida tradicionalmente por maca, maina, maca-chicha, ginseng-dos-andes, ginseng peruano e maca peruana (Gonzales, 2011).

A Maca é um tubérculo rico em fibras, nutrientes e compostos bioativos como isoflavonas, quercetina e antocianinas, responsáveis por proporcionar diversos benefícios à saúde, (Da Silva Leitão Peres *et al.*, 2020). As principais classes de fitoquímicos encontradas na Maca são glucosinolatos, isotiocianatos, macaene e macamidas, alcaloides, (tio) hidantoínas, flavonoides, catequinas e fitoesteroides (Wang; Zhu, 2019), sendo que as macamidas constituem um grupo de metabólitos secundários encontrados apenas na Maca, ao qual é atribuída boa parte de sua funcionalidade (Zhu *et al.*, 2020).

É nativa do Peru, mas pode ser encontrada na Bolívia, Colômbia, Chile e Argentina. O hipocótilo da Maca é fundido à raiz formando um tubérculo que contém as substâncias de reserva e constituintes responsáveis pelas propriedades atribuídas à planta. Com aspecto parecido ao rabanete, mede de 2,5 a 6 cm e possui coloração diversificada, que vai do amarelo ao preto, caracterizando treze quimiotipos diferentes (Minich *et al.*, 2024).

As diferentes cores disponíveis de Maca, três delas exemplificadas na Figura 1, influenciam positivamente sua ação farmacológica e biológica. A Maca amarela é a forma mais amplamente utilizada e pesquisada: está relacionada ao aumento de energia, melhora da concentração e o do equilíbrio hormonal (Bower-Cargill; Yarandi; Petróczi, 2022). A Maca Vermelha possui o maior teor de fitoquímicos entre os demais tipos de maca, sendo conhecida como o tipo mais eficiente para mulheres, uma vez que seus efeitos estão relacionados ao equilíbrio hormonal e à sua ação na saúde óssea. A mais rara é a Maca preta, que está relacionada principalmente ao ganho muscular, a resistência, ao foco mental e a libido (Santos *et al.*, 2021).

Fotografia 1 - Amostras desidratadas de Maca Amarela, Vermelha e Preta (da esquerda para a direita).



Fonte: Autora (2023).

Estudo realizado por (Zhang *et al.*, 2006) verificou melhora da massa óssea e da restauração do tecido ósseo trabecular das vértebras lombares de ratas OVX em resposta à administração do extrato etanólico de Maca. Outro estudo com ratas OVX usando o extrato da Maca Vermelha em diferentes dosagens, observou um aumento dos níveis de IFN- γ de forma dose-dependente, favorecendo a imunidade inata (Leiva-Revilla *et al.*, 2014). Também já foi demonstrado que a Maca está relacionada a atividade antidepressiva neste modelo animal (Rubio *et al.*, 2006). Em ratos hipercolesterolêmicos, diferentes tipos de Maca foram administradas e promoveram redução dos níveis de CT, LDL e triglicérides, além da redução dos níveis de fibrinogênio, relacionado ao desenvolvimento de aterosclerose (Večeřa *et al.*, 2007a).

Assim, a Maca faz parte da tradição culinária e medicinal peruana há centenas de anos. Além disso, é amplamente utilizada na medicina complementar para tratar infertilidade, redução da libido, falta de vigor físico, distúrbios da memória e sintomas da menopausa (Teixeira *et al.*, 2020). Há algum tempo vem ganhando notoriedade na comunidade científica mundial e tem sido alvo de pesquisas antropológicas, etnofarmacológicas, fitoquímicas, nutricionais, ensaios *in vitro* e *in vivo*, e revisões de literatura (Dokkedal-Silva *et al.*, 2024). Estas evidências despertaram o interesse para a investigação proposta neste estudo, de forma a explorar o potencial uso terapêutico para auxiliar o manejo das manifestações associadas à menopausa.

3 OBJETIVOS

A seguir serão apresentados os objetivos gerais e específicos do presente trabalho:

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da administração oral de Maca Vermelha sobre parâmetros metabólicos, comportamentais e sobre o perfil de microbiota intestinal de ratas Wistar ovariectomizadas (OVX).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

São objetivos específicos do presente trabalho:

- a) Caracterizar a composição da Maca Vermelha e sua atividade antioxidante, comparando-a a dados previamente descritos na literatura;
- b) Avaliar, em ratas OVX, os efeitos do tratamento (via oral) por 21 dias com a Maca Vermelha sobre:
 - a variação de massa corporal;
 - o perfil lipídico;
 - a glicemia casual;
 - a variação da massa de tecidos endócrinos ou órgãos-alvo da ação estrogênica: útero, hipófise, adeno-hipófise, timo, tecidos adiposos branco e marrom;
 - o perfil da microbiota intestinal;
 - parâmetros comportamentais.

4 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista o crescimento da população idosa no Brasil, sendo a população feminina a sua maioria, cada vez mais mulheres vão experimentar mudanças relacionadas ao climatério e à menopausa, como, por exemplo, o aumento do risco cardiovascular, pela redução da ação cardioprotetora dos estrógenos endógenos. Sabendo que a reposição hormonal com estrogênio vem sendo repensada devido a seus efeitos colaterais, é de extrema importância que estudos com tratamentos alternativos, usando alimentos funcionais, sejam realizados a fim de buscar melhora da qualidade de vida para as mulheres nesta fase da vida. Considerando que a Maca possui em sua composição compostos bioativos sabidamente relacionados à melhora da saúde, buscou-se investigar os potenciais efeitos desse alimento funcional sobre as principais complicações decorrentes da menopausa, incluindo alterações no perfil da microbiota intestinal.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DA MACA VERMELHA

A farinha da Maca Vermelha foi obtida comercialmente, sua composição centesimal (umidade, cinzas e lipídeos) foi realizada de acordo com o proposto pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC). O teor de umidade foi realizado com base na determinação gravimétrica de voláteis a 105 °C, em estufa com circulação forçada de ar até peso constante; o teor de cinzas foi determinado como resíduo mineral fixo, por gravimetria, utilizando-se mufla a 550 °C até peso constante; o teor de lipídeos foi determinado pelo método de Soxhlet por extração contínua com solvente éter de petróleo (Cunniff P., 1995).

O teor de proteínas foi determinado através da quantificação de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl conforme descrito *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), e conversão à proteína por utilização do fator 6,25. Os carboidratos totais foram calculados por diferença, a partir da fração NIFEXT, diminuindo-se a soma dos demais componentes de 100 g de amostra (Cunniff P., 1995).

Todos estes procedimentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Nutrição Experimental da UNIFAL-MG.

5.1.1 Extrato metanólico

As amostras de farinha de Maca Vermelha sofreram extração em metanol (80 %), na proporção de 1:20, por três vezes, com base na metodologia proposta por (Lee; Chang, 2019). Após agitação por 24 h, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, e conservados a -10 °C até a realização das análises, todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.2 DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

Os extratos metanólicos, preparados conforme descrito no item 5.1.1, tiveram seu teor de fenólicos totais determinados conforme descrito por (Boateng *et al.*, 2008), utilizando-se 125 µg de amostra, 125 µg de reagente de *Folin-Ciocalteu*, 1,25

mL de água destilada e 50 µg de solução de carbonato de sódio, por 1 hora no escuro, com leitura a 750 nm, e a curva de ácido gálico como padrão. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico/g de amostra.

5.3 DETERMINAÇÃO DE FLAVONOIDES

Para a determinação de flavonoides foram utilizados os extratos metanólicos obtidos conforme descrito em 5.1.1, utilizando-se método descrito por (Boateng *et al.*, 2008), utilizando-se 125 µg de amostra, 500 µg de água destilada, 37 µg de nitrito (5 %). Após agitação e intervalo de 5 minutos foi adicionado 37 µg de solução de cloreto de alumínio. A leitura a 517 nm foi realizada após nova agitação e intervalo de 5 minutos, com utilização de curva padrão de catequinas como referência. Os resultados foram expressos em equivalentes de catequinas/g de amostra.

5.4 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE, PELA CAPTURA DO RADICAL DPPH E ABTS⁺

A determinação do potencial antioxidante dos extratos foi realizada conforme o proposto por (Brand-Williams; Cuvelier; Berset, 1995), com leitura em 517 nm para DPPH e 734 nm para ensaio com ABTS. Para efeito de cálculos, foi utilizada uma curva analítica de Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-Carboxylic Acid) na faixa de concentração de 0 a 7 nmols de Trolox e os resultados foram expressos em µmols de equivalente de Trolox/g de amostra.

5.5 ANIMAIS

Foram utilizadas 60 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) adultas de aproximadamente seis semanas (200 g), provenientes do Biotério Central da UNIFAL-MG. Os animais foram inicialmente acondicionados em gaiolas coletivas (4-5 animais por caixa) no biotério de manutenção do Laboratório de Fisiologia (ICB-UNIFAL-MG), em sala climatizada a 21 ± 2 °C e mantida em ciclo controlado de 12 horas de claro-escuro. Após a aclimatação por 2-3 dias, os animais foram divididos

nos grupos OVX (submetidos à ovariectomia bilateral) ou SHAM (submetidos à cirurgia fictícia) e, em seguida, transferidos para caixas individuais, onde foram mantidos durante todo o experimento. Para este estudo, utilizou-se uma suspensão da farinha da Maca Vermelha, obtida comercialmente, em água destilada a 5 % (m/v), preparada diariamente, administrada via gavagem (Fotografia 2). Desta forma, o presente estudo contou com 4 grupos experimentais, sendo 2 deles de ratas OVX e 2 de ratas SHAM, 2 Grupos C: dieta padrão e água *ad libitum* + 100 mg/Kg/mL de água destilada via gavagem; e 2 Grupos M: dieta padrão, água *ad libitum* + 100 mg/Kg/mL da suspensão de Maca Vermelha via gavagem.

Após 21 dias consecutivos de tratamento, os animais foram anestesiados e eutanasiados para retirada do útero, hipófise, adeno-hipófise, timo, tecidos adiposos branco e marrom e do plasma sanguíneo para as análises de glicemia casual, colesterol total, triglicerídeos, lactato e cálcio. Durante o experimento, a massa corporal dos animais foi aferida diariamente, sempre no mesmo horário do dia. Todos os procedimentos foram conduzidos em acordo ao “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (National Research Council, 2011), respeitando-se os princípios éticos da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (“Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - Princípios Éticos”, [s.d.]) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da UNIFAL/MG (n° 005/2022).

Fotografia 2 - Tratamento com Maca Vermelha via gavagem.



Fonte: Autora (2023).

5.5.1 Cirurgia de ovariectomia bilateral

As ratas foram anestesiadas com mistura de cloridrato de xilazina (10 mg/Kg) e cloridrato de cetamina (90 mg/Kg), em um volume de 0,1 mL de solução para 100 g de massa corporal. Os reflexos dos animais foram testados para dar início aos procedimentos cirúrgicos conferindo a efetividade do efeito anestésico. Em resumo, nas ratas ovariectomizadas (OVX), os ovários foram localizados, expostos e extirpados, procedendo-se a sutura das camadas muscular e da pele, bilateralmente. Como controle cirúrgico, um grupo de animais foi submetido à cirurgia fictícia (SHAM), em que não ocorre a retirada dos ovários, apenas o deslocamento destes para fora da cavidade, para simular o mesmo procedimento. No pós-operatório, os animais receberam analgesia com Flunixin meglumina (Banamine®, 2,5 mg/Kg, por via subcutânea, uma vez a cada 12 h, por 3 dias consecutivos) e Tramadol (12,5 mg/kg, por via subcutânea, uma vez a cada 8 horas, por 36 h). Os animais também receberam no pós-cirúrgico imediato uma dose profilática de pentabiótico para animais de pequeno porte (Fort Dodge, 0,1 mL/100 g de massa corporal) por via intramuscular.

5.6 ANÁLISES PLASMÁTICAS

Ao final do tratamento, os animais foram anestesiados por dose letal de anestésico inalatório (isoflurano), decapitados e o sangue truncal foi coletado em tubos heparinizados. Em seguida, o sangue foi centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm e 4 °C, e o plasma utilizado para determinação da glicemia casual, colesterol total (CT), triglicérides (TG), lactato e cálcio, por métodos enzimáticos colorimétricos (Interkit), de acordo com instruções do fabricante.

5.7 ANÁLISE DA MICROBIOTA INTESTINAL POR PCR EM TEMPO REAL

Após a eutanásia, uma amostra do conteúdo cecal também foi coletada para determinar o perfil da microbiota intestinal por PCR em tempo real. Para tanto, amostras de 5 animais de cada grupo experimental foram coletadas assepticamente em pools (um para cada grupo experimental). O DNA total foi extraído dos pellets fecais de acordo com os dados do fabricante do PureLink™ Microbiome DNA

Purification Kit (Thermo Fischer Scientific, Van Allen Way Carlsbad, CA, EUA). O DNA total foi purificado em uma coluna de centrifugação Invitrogen e quantificado usando um fluorômetro Qubit Invitrogen (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA). Uma quantidade de 15 ng de DNA total foi usada para analisar os genes do RNA ribossômico 16S (rRNA) por poço, usando os primers específicos para bactérias totais, Bacteroidetes, Firmicutes ou Gammaproteobacteria da seguinte forma:

Bactérias totais F	5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3,	Bactérias totais R	5' -
AAGGAGGTGWTCCARCC-3,	Bacteroidetes	F	5' -
GTTTAATTCGATGATACGCGAG-3,	Bacteroidetes	R	5' -
TTAASCCGACACCTCACGG-3,	Gammaproteobacteria	F	5' -
GCTAACGCATTAAGTRYCCCG-3,	Gammaproteobacteria	R	5' -
GCCATGCRGCACCTGTCT-3,	Firmicutes	F	5' -
GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA-3,	Firmicutes	R	5' -
AGCTGACGACAACCATGCAC-3.			

A qPCR em tempo real foi conduzida em um volume final de 10 µL contendo o seguinte: SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), DNA como molde de PCR e 20 µM de primers. A reação de PCR foi realizada com o sistema ABI 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando os seguintes parâmetros de ciclagem: 60 °C por 10 min, 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min, e um estágio de dissociação de 95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min, 95 °C por 15 s, 60 °C por 15 s. As medições de qPCR foram conduzidas em triplicado e os dados foram apresentados como unidades arbitrárias em relação ao grupo de controle SHAM. As análises foram realizadas em parceria com o Laboratório de Imunologia da UNIFAL-MG.

5.8 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO EM CAMPO ABERTO

O campo aberto é um modelo utilizado para análise da atividade locomotora e de parâmetros comportamentais dos animais. Consiste em uma arena redonda com o piso branco, dividido em 12 quadrantes, com uma parede transparente de 0,39 m ao redor da periferia. O teste é realizado em uma sala pequena, sem janelas (Valle, 1970) e sem ruídos, com iluminação e temperatura controladas.

Os animais foram ambientados no aparato um dia antes, durante 10 minutos

e, no dia seguinte, colocados individualmente no centro da arena e filmados durante 10 minutos, posteriormente, foram observados seu tempo de permanência no centro e na periferia do aparato. Após cada teste, o aparato foi limpo com álcool 10 % (Chagas *et al.*, 2021; Valle, 1970).

5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão (EP). A análise de variância (ANOVA), seguida do teste posthoc de Sidak, foi utilizada para comparar as médias entre os diferentes grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (bicaudal). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad InStat, versão 3.05, para Windows (GraphPad Prism, San Diego, CA, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 COMPONENTES DA MACA VERMELHA

6.1.1 Composição centesimal

A composição centesimal da amostra de Maca Vermelha analisada encontra-se descrita na Tabela 1, onde o conteúdo de carboidratos totais considera também a fração de fibras presentes na amostra.

Tabela 1 - Composição centesimal da Maca Vermelha

Componente	Base úmida %	Base seca %
Umidade	7,04 ± 0,03	-
Cinzas	6,72 ± 0,05	7,23 ± 0,05
Lipídios	1,89 ± 0,08	2,03 ± 0,09
Proteínas	11,86 ± 0,68	12,76 ± 0,73
Carboidratos totais*	72,49	77,98

Fonte: Autora (2025)

Nota: *Inclui a fração fibra e carboidratos metabolizáveis.

6.1.2 Fenólicos totais

Na amostra analisada, o conteúdo de fenólicos totais da Maca Vermelha encontra-se descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição de fenólicos totais da Maca Vermelha

	Fenólicos totais (mg de EAG*/g de amostra)			
	R1	R2	R3	Média
Base úmida	6,38 ± 0,03	5,97 ± 0,03	6,30 ± 0,03	6,22 ± 0,21
Base seca	6,86 ± 0,03	6,43 ± 0,03	6,78 ± 0,03	6,69 ± 0,23

Fonte: Autora (2025)

Nota: *EAG: Equivalente de ácido gálico.

6.1.3 Flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais da Maca Vermelha foi analisado e descrito na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição de flavonoides totais da Maca Vermelha

	Flavonoides totais (mg de EC*/g de amostra)			
	R1	R2	R3	Média
Base úmida	0,65 ± 0,05	0,63 ± 0,04	0,63 ± 0,04	0,64 ± 0,01
Base seca	0,70 ± 0,03	0,68 ± 0,05	0,67 ± 0,04	0,68 ± 0,01

Fonte: Autora (2025)

Nota: *EC: Equivalentes de catequinas.

6.1.4 Determinação do potencial antioxidante, pela captura do radical DPPH e ABTS⁺

Na amostra analisada o potencial antioxidante da Maca Vermelha está descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Potencial antioxidante da Maca Vermelha, pela captura do radical DPPH e ABTS⁺

	(μmol de ET*/g de amostra)			
	R1	R2	R3	Média
DPPH	130,84 ± 1,95	129,03 ± 7,34	132,05 ± 8,48	130,64 ± 1,52
ABTS ⁺	39,93 ± 1,37	38,78 ± 8,47	43,11 ± 1,55	40,61 ± 2,24

Fonte: Autora (2025)

Nota: *ET: Equivalentes de TROLOX/g de amostra.

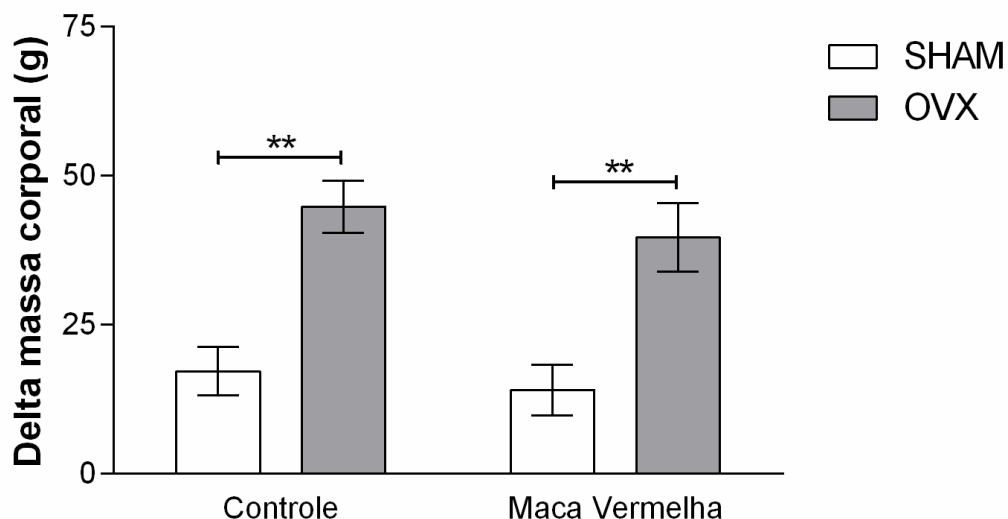
6.2 EFEITOS DO TRATAMENTO COM MACA VERMELHA SOBRE PARÂMETROS METABÓLICOS

6.2.1 Evolução ponderal

Conforme demonstrado na Figura 1, os grupos OVX, independentemente do tratamento com a Maca Vermelha, apresentaram um maior delta de peso, quando

comparados aos grupos SHAM (Controle: $17,20 \pm 4,07$ vs OVX $44,84 \pm 4,34$, $p < 0,01$; Maca vermelha: $14,07 \pm 4,21$ vs OVX $39,66 \pm 5,75$, $p < 0,01$). O tratamento com a Maca Vermelha não preveniu o ganho de peso nos animais OVX.

Figura 1 - Delta da massa corporal (g), em animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias.



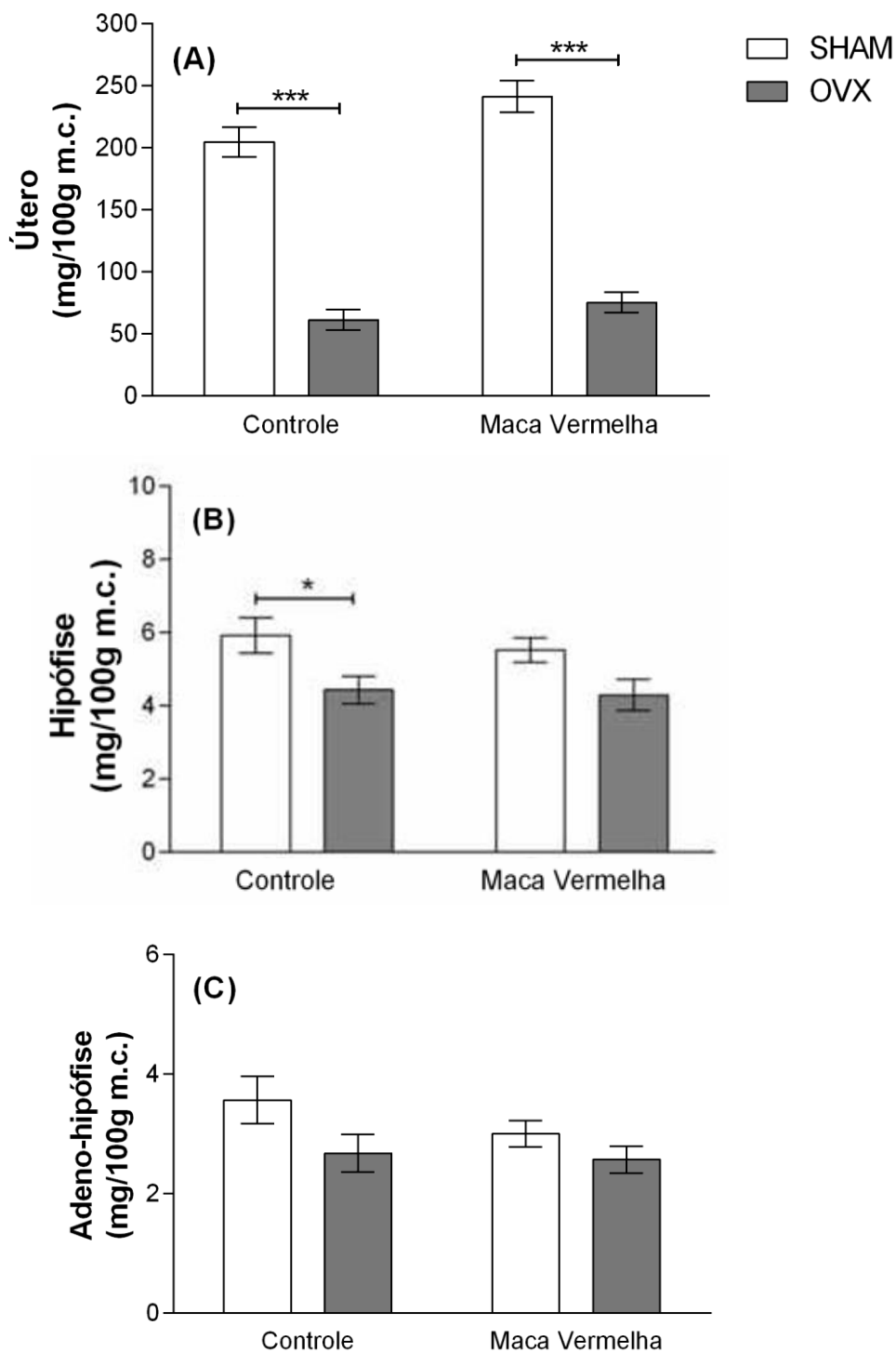
Fonte: Autora (2025)

Nota: Os resultados são expressos como média \pm erro padrão (EP) e foram analisados por ANOVA bidirecional, seguido pelo pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

6.2.2 Massa relativa de tecidos endócrinos e tecidos-alvo da função estrogênica

Em nosso estudo, conforme demonstrado na Figura 2A, ficou claro o efeito da OVX na redução da massa uterina, independentemente do tratamento (Controle: $204,91 \pm 11,98$ vs $61,49 \pm 08,02$, $p < 0,001$; Maca Vermelha: $241,46 \pm 12,62$ vs $75,39 \pm 08,14$, $p < 0,001$).

Figura 2 - Massas relativas (mg/100 g de peso corporal) do útero (A), hipófise (B) e adeno-hipófise (C) em animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias.



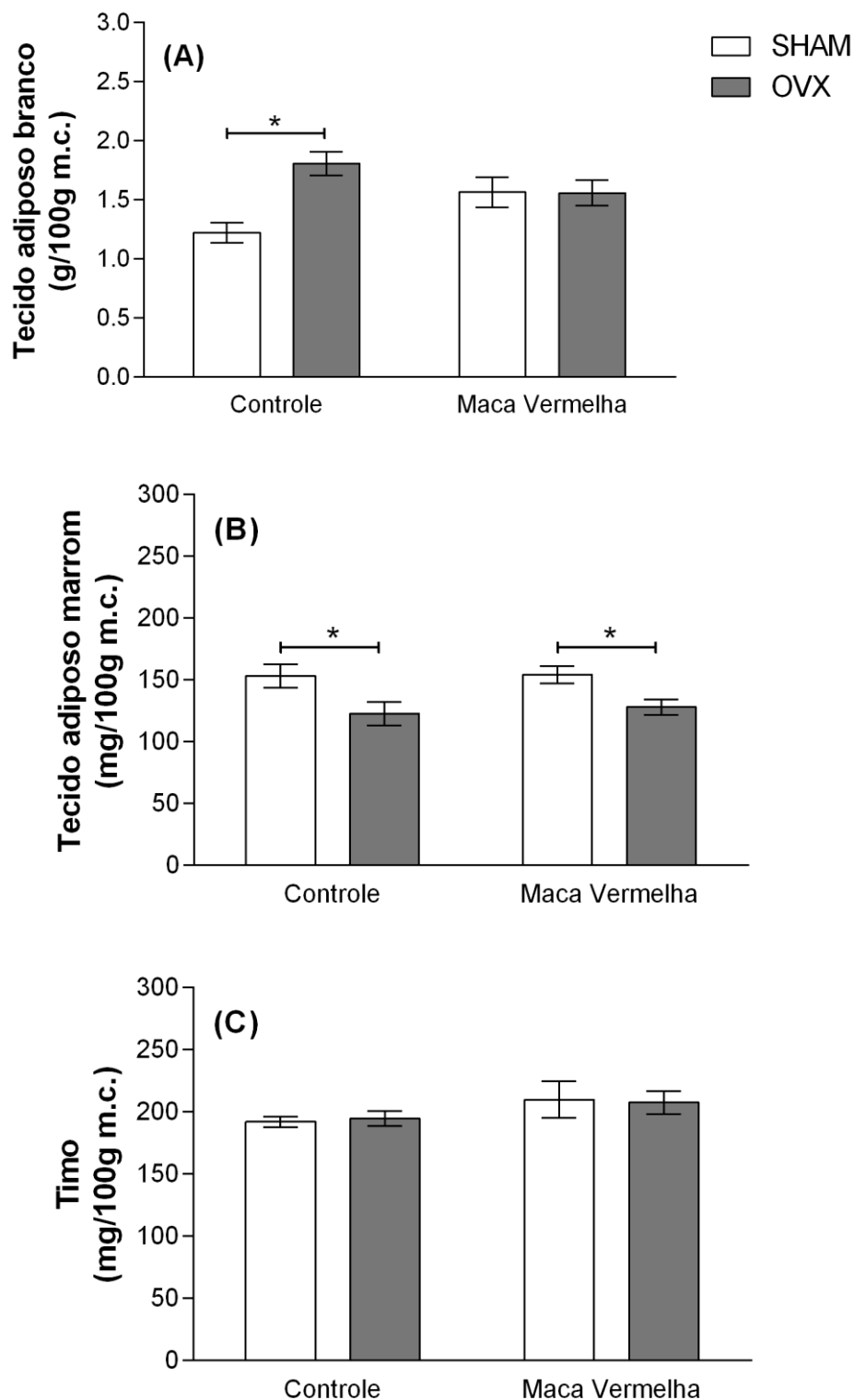
Fonte: Autora (2025)

Nota: Os resultados são expressos como média \pm erro padrão (EP) e foram analisados por ANOVA bidirecional, seguido pelo pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Assim, apesar de não termos realizado as dosagens plasmáticas de 17β -estradiol, FSH ou LH, é possível inferir, pela significativa redução da massa hipofisária nos animais OVX (Controle: $4,55 \pm 0,26$ vs Maca Vermelha: $4,19 \pm 0,25$, $p < 0,05$ Figura 2B), que os níveis de gonadotrofinas devem estar de normais a reduzidos nos animais tratados com veículo. A Maca Vermelha, neste modelo, preveniu a redução da massa hipofisária no grupo OVX, uma vez que o efeito estatístico da cirurgia, neste grupo, foi abolido. Apesar de as gonadotrofinas serem produzidas na adeno-hipófise, não houve efeito estatístico claro nesta avaliação, apesar da mesma tendência ter sido observada.

Além disso, conforme demonstrado a seguir (Figura 3), a OVX diminuiu significativamente a massa relativa do tecido adiposo marrom (TAM, Figura 3B), independentemente do tratamento com a Maca Vermelha (Controle: $153,36 \pm 9,48$ vs $122,92 \pm 9,52$, $p < 0,05$; Maca Vermelha: $154,35 \pm 6,99$ vs $128,05 \pm 6,08$, $p < 0,05$). O tratamento com a Maca Vermelha preveniu o aumento do TAB (Figura 3A), quando comparado com o grupo controle OVX (Controle: $1,22 \pm 0,08$ vs $1,80 \pm 0,09$, $p < 0,05$; Maca Vermelha: $1,56 \pm 0,12$ vs $1,56 \pm 0,10$, $p < 0,05$). Por outro lado, não foram encontradas diferenças significativas na massa do timo entre os grupos experimentais.

Figura 3 - Variação da massa relativa do tecido adiposo branco (g/100 g de m.c.), massa relativa do tecido adiposo marrom (mg/100 g de m.c.), massa relativa do timo (mg/100 g de m.c.) em animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias.



Fonte: Autora (2025)

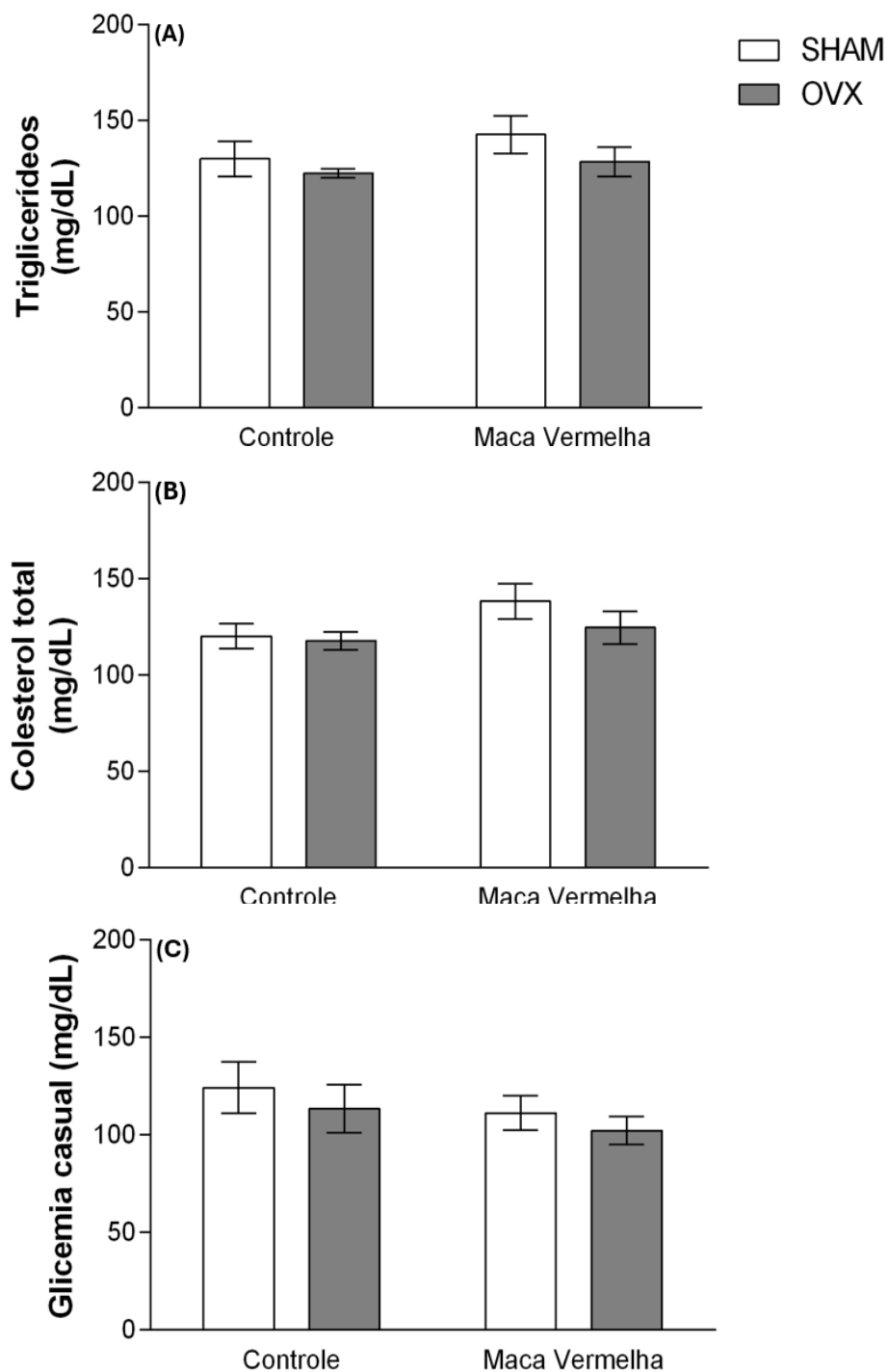
Nota: Os resultados são expressos como média \pm erro padrão (EP) e foram analisados por ANOVA bidirecional, seguido pelo pós-teste de Sidak. * p < 0,05, ** p < 0,01 e *** p < 0,001.

6.2.3 Análises plasmáticas

No presente estudo, os níveis séricos de TG e CT não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 4A e 4B). Além do mais, dados anteriores não publicados do nosso grupo indicaram que 6 semanas de OVX são suficientes para induzir resistência à insulina, avaliada pela resposta ao teste de tolerância oral à glicose. Porém, os dados atuais mostram que não houve diferença significativa entre os grupos na glicemia casual (Figura 4C).

Além do mais, o grupo OVX tratado com a Maca Vermelha apresentou níveis de lactato significativamente mais elevados em comparação ao respectivo grupo SHAM ($24,26 \pm 4,30$ vs $40,61 \pm 3,76$, $p < 0,05$, Figura 5A), não sendo este efeito observado nos animais controle. Os níveis séricos de cálcio total não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figura 5B).

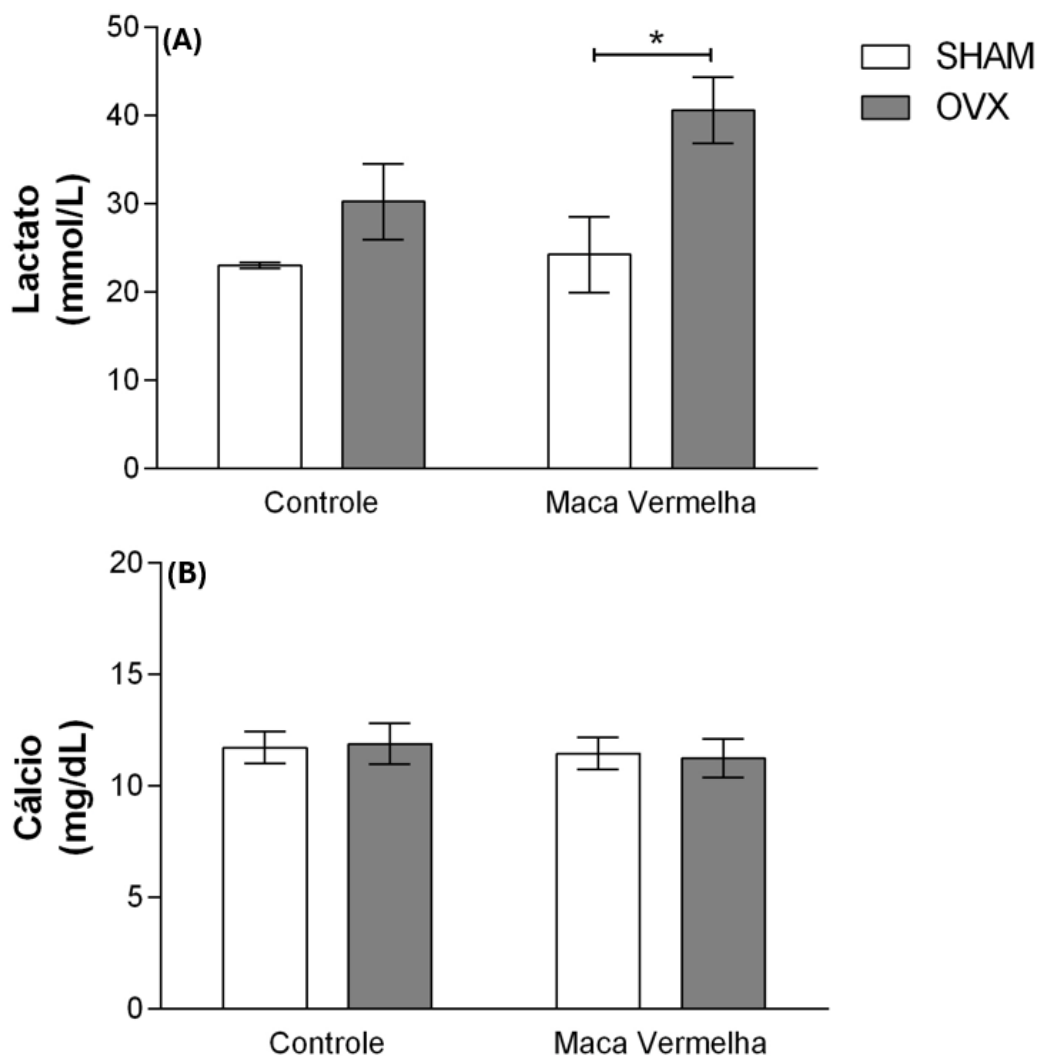
Figura 4 - Concentrações plasmáticas de triglicérides (A), colesterol total (B) e glicemia casual (C) em animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias.



Fonte: Autora (2025)

Nota: Os resultados são expressos como média \pm erro padrão (EP) e foram analisados por ANOVA bidirecional, seguido pelo pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 5 - Concentrações plasmáticas de lactato (A) e cálcio total (B) em animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias.



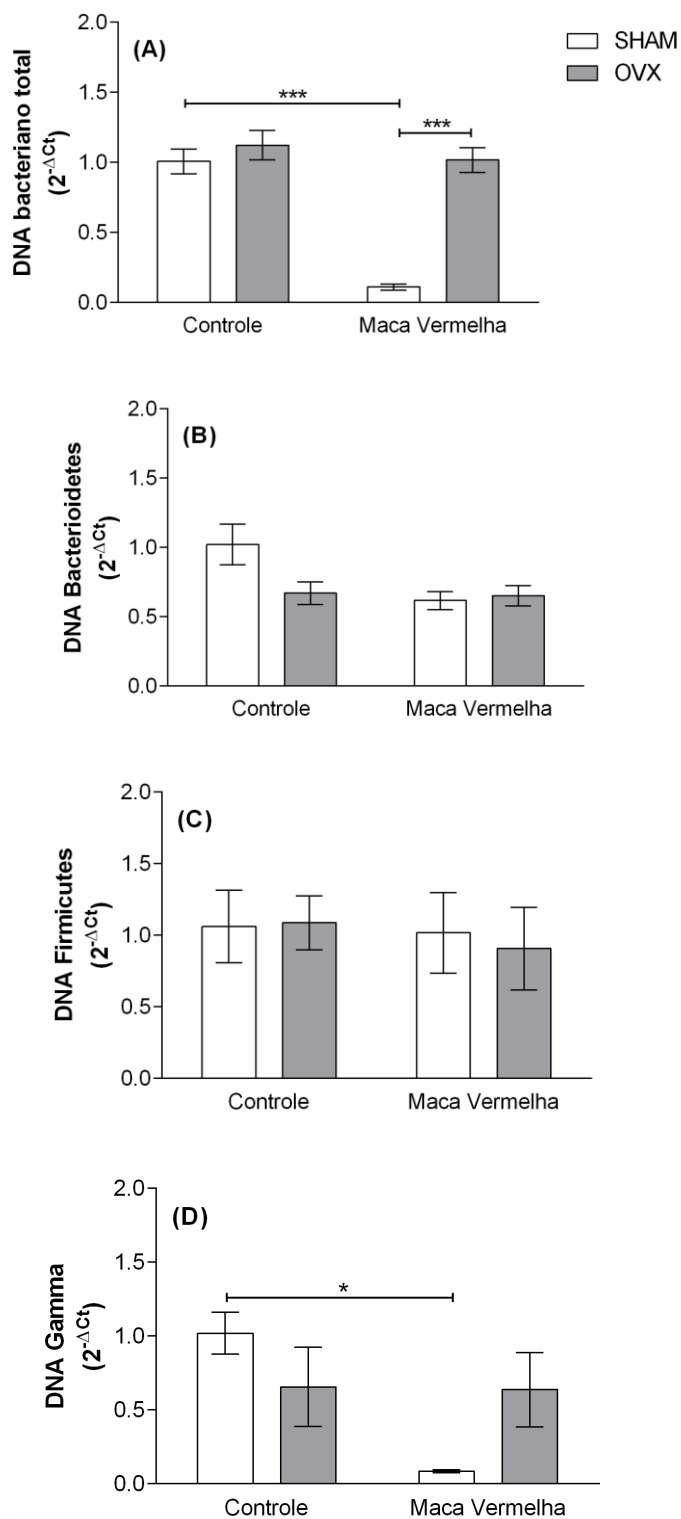
Fonte: Autora (2025).

Nota: Os resultados são expressos como média \pm erro padrão (EP) e foram analisados por ANOVA bidirecional, seguido pelo pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

6.3 MICROBIOTA INTESTINAL

Ao analisar o conteúdo de Bacteroidetes (Figura 6B) e Firmicutes (Figura 6C), observamos que não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 6 - DNA bacteriano total (em $2^{-\Delta Ct}$, 6A), DNA de Bacteroidetes (em $2^{-\Delta Ct}$, 6B), DNA de Firmicutes (em $2^{-\Delta Ct}$, 6C) e DNA de Gammabacteria (em $2^{-\Delta Ct}$, 6D) em amostras fecais obtidas de animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias.



Fonte: Autora (2025)

Nota: Os resultados são expressos como média \pm erro padrão (EP) e foram analisados por ANOVA bidirecional, seguido pelo pós-teste de Sidak. * p < 0,05 e *** p < 0,001.

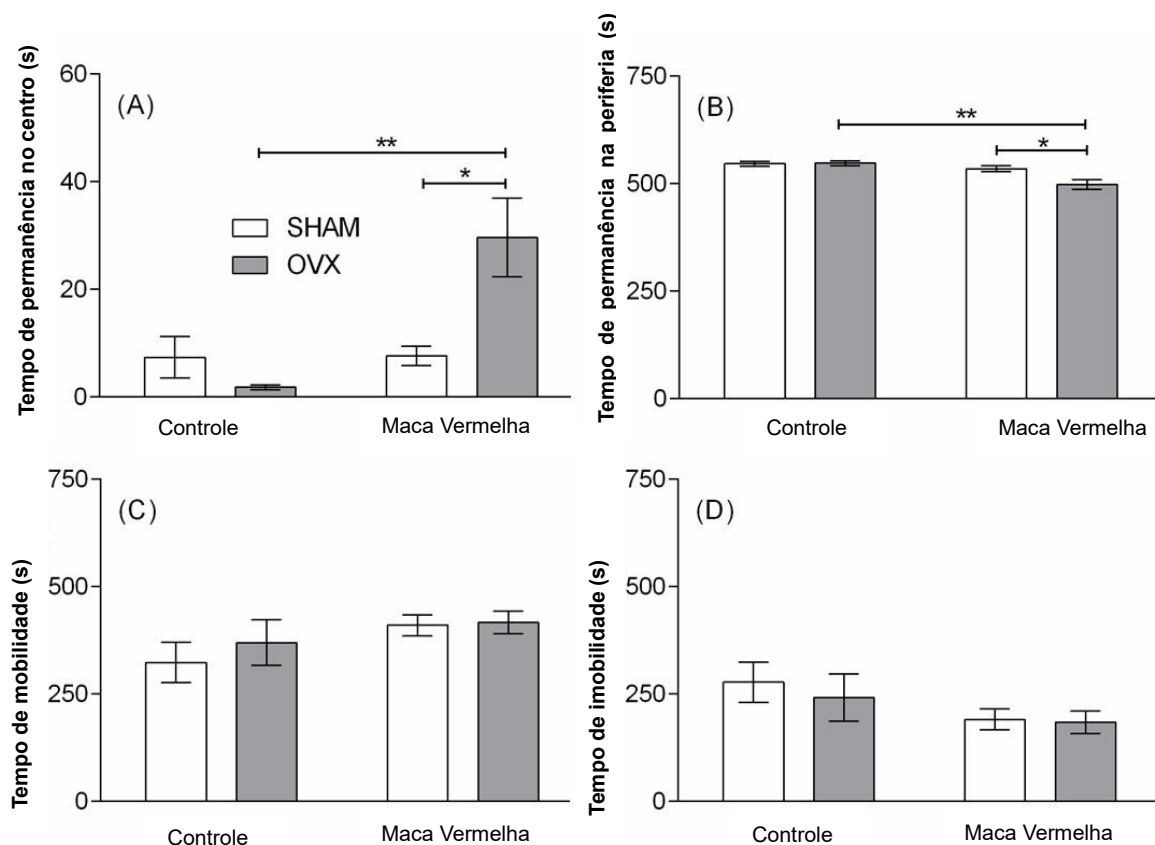
No entanto, houve redução significativa no filo Gamma dos animais SHAM tratados com Maca Vermelha, quando comparados ao grupo SHAM Controle (Controle: $1,01 \pm 0,14$; Maca Vermelha: $0,08 \pm 0,009$), refletindo sobre o conteúdo bacteriano total (Controle: $1,00 \pm 0,08$; Maca Vermelha: $0,11 \pm 0,02$) (Figura 6A).

6.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO EM CAMPO ABERTO

De acordo com os resultados do teste de campo aberto, não foram encontradas diferenças nos tempos passados no centro ou na periferia entre os animais SHAM e OVX tratados com o veículo. Por outro lado, os ratos OVX tratados com Maca Vermelha apresentaram maior permanência no centro do aparelho, seja quando comparados ao grupo OVX Controle ou aos animais SHAM tratados com Maca (Figura 7A). Portanto, efeitos estatisticamente relevantes neste parâmetro foram encontrados para o tratamento com Maca Vermelha [$F(1, 13) = 8,61, p < 0,05$], e também para a interação entre o tratamento e a função gonadal [$F(1, 13) = 8,28, p < 0,05$].

Conseqüentemente, o tratamento com Maca Vermelha diminuiu a permanência de ratos OVX na periferia, tanto em comparação com os animais OVX do grupo controle quanto com o grupo tratado com SHAM (Figura 7B). No entanto, sob o ponto de vista estatístico, apenas o tratamento com Maca Vermelha apresentou efeito significativo neste parâmetro [$F(1, 13) = 11,89, p < 0,01$]. Não foram induzidas alterações significativas pelo tratamento com OVX ou com Maca Vermelha no tempo de mobilidade (Figura 7C) e imobilidade (Figura 7D).

Figura 7 - Tempo de permanência no centro (em segundos, 7A), tempo de permanência na periferia (em segundos, 7B), tempo de mobilidade (em segundos, 7C) e tempo de imobilidade (em segundos, 7D) em animais SHAM (barras brancas) ou OVX (barras cinzas) tratados por gavagem com veículo (Controle) ou suspensão de Maca Vermelha (100 mg/kg/dia) por 21 dias e submetidos ao teste de campo aberto.



Fonte: Autora (2025)

Nota: Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (EP) e analisados por ANOVA bidirecional, seguido pelo pós-teste de Sidak. * p < 0,05 e ** p < 0,01.

7 DISCUSSÃO

A maioria dos estudos que demonstram as propriedades da Maca relacionadas à saúde foram realizados com extratos aquosos ou hidroalcoólicos, com seus efeitos atribuídos a glucosinolatos, polifenóis e suas atividades antioxidantes (Wang; Zhu, 2019). Estudos demonstram que a eficácia dos extratos aquosos de Maca melhora após a fervura, sugerindo que o tratamento térmico facilita a extração de metabólitos secundários (Gonzales, 2011). A preparação da Maca Vermelha para este estudo foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, presentes na rotulagem do produto, sem aquecimento. As dosagens de Maca já estudadas neste modelo animal variaram de 0,096 g/kg/dia (Zhang *et al.*, 2006) a 1,0 g/kg/dia (Rubio *et al.*, 2006).

Os mecanismos pelos quais a Maca exerce sua funcionalidade ainda não são muito claros. Autores sugerem que seu efeito no equilíbrio hormonal esteja relacionado à presença de alcaloides, como berberina e norzoantamina, que atuam no eixo hipotálamo-hipófise e nas glândulas suprarrenais (Wang *et al.*, 2007). Além disso, a Maca contém muito cálcio, magnésio e uma boa quantidade de sílica, útil na reposição da perda de cálcio ósseo em mulheres na menopausa e tendo efeito antioxidante (Minich *et al.*, 2024). A Maca também contém substâncias semelhantes a esteroides, capazes de aumentar a testosterona e a progesterona no sangue em ratos, segundo Bower-Cargill, Yarandi e Petróczi (2022), além dos efeitos já descritos sobre a microbiota intestinal (Zhu *et al.*, 2022).

A composição centesimal da amostra de Maca Vermelha analisada (Tabela 1), quanto aos carboidratos somados ao teor de fibras, foi semelhante à encontrada em amostras analisadas anteriormente, que apresentaram de 50 a 70 % de carboidratos e 8 a 16 % de fibras (Valentová *et al.*, 2008). O teor de lipídios também foi semelhante na matéria úmida (2 %) e na matéria seca (4 %) (Chen; Li; Fan, 2017). O teor total de fenólicos foi inferior ao encontrado por outros autores utilizando farinha mista de Maca Amarela, Vermelha e Preta e o extrato hidroalcoólico de Maca Vermelha, sendo 8,99 mg/g, segundo Campos *et al.* (2013) e 11,6 mg/g, segundo Zevallos-Concha *et al.* (2016). Entretanto, o teor total de flavonoides da Maca Vermelha foi superior ao encontrado em outro estudo utilizando extrato metanólico (0,01 ± 0,17 mgQE/100 g de peso seco) (Lee; Chang, 2019). O teor de flavonoides está relacionado à capacidade de eliminar radicais por meio da ligação com suas

hidroxilas, contribuindo para a atividade antioxidante (Dias *et al.*, 2021). Agliconas, laricitrina e ligustroflavona são flavonoides já identificados em extratos metanólicos de Maca (Lee; Chang, 2019).

Sobre a capacidade antioxidante, o corpo humano possui um sistema capaz de neutralizar o estresse oxidativo, constituído por enzimas como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx), a glutathione redutase (GR) e as peroxirredoxinas (PRx). Na deficiência desse mecanismo ou no estresse oxidativo excessivo, há um desequilíbrio que leva ao aumento da atividade das espécies reativas de oxigênio (ROS). O consumo de uma dieta rica em polifenóis fortalece e restaura essa homeostase pelo aumento da atividade antioxidante (Zhang; Tsao, 2016).

Uma maneira de avaliar a capacidade antioxidante de produtos naturais é através da captura de radicais, que se dá pela capacidade de doação de hidrogênios aos radicais livres, convertendo-os em espécies não-tóxicas e inibindo a oxidação lipídica (Lee; Chang, 2019). Nesse sentido, a eliminação de radicais DPPH é frequentemente utilizada para avaliar a atividade antioxidante de produtos naturais, extratos metanólicos de folhas e raízes de Maca apresentaram efeito positivo para esse parâmetro, apresentando maior concentração de antioxidantes nas folhas (Lee; Chang, 2019). Além disso, o potencial antioxidante pelo método ABTS+ foi investigado em três genótipos de Maca (Amarela, Vermelha e Preta), observando-se melhores resultados na Maca Vermelha utilizada 75 a 90 dias pós-colheita, com valores semelhantes aos encontrados em nosso estudo (Yábar; Chirinos; Campos, 2019).

Considerando os efeitos já investigados da Maca, e os sintomas decorrentes da menopausa, o modelo experimental adotado, foi a OVX que é conhecida experimentalmente desde a década de 1980 por acelerar, em ratas, o ganho de massa corporal, especialmente de tecido adiposo. Algumas das possibilidades são a relação entre a deficiência de estrogênio e a diminuição dos receptores de leptina no hipotálamo, reduzindo a sensação de saciedade, e a diminuição do gasto energético causado pela deficiência de estrogênio (Burch *et al.*, 2022). O hipoestrogenismo também é apontado como a principal causa responsável pela obesidade, sintomas vasomotores, urogenitais e psicológicos, menor desempenho sexual e pelo perfil de morbimortalidade em mulheres após os 50 anos de idade (Camon; Garratt; Correa, 2024).

Estudos anteriores realizados com animais demonstraram que a deficiência de estrogênio está associada também à hiperfagia transitória e à redução da atividade espontânea, alterações que foram revertidas com a reposição de estrogênio (Gavin *et al.*, 2018). Em um modelo pós-menopausa, camundongos fêmeas (com idade entre 2–4 semanas) após OVX exibiram expressão diminuída de receptores nucleares e proteínas necessárias para gasto eficiente de energia em tecido adiposo e músculo, em relação a camundongos controle SHAM. Além disso, camundongos OVX exibiram expressão diminuída de enzimas envolvidas na β -oxidação de ácidos graxos e fatores de transcrição necessários para lipólise (Kamei *et al.*, 2005). Em animais sedentários, a Maca Vermelha foi capaz de prevenir o ganho de peso e, quando associada à atividade física, potencializou a perda de peso nesses animais (Choi *et al.*, 2012). Em nosso estudo, não observamos efeitos benéficos do tratamento isolado com Maca Vermelha sobre o ganho de peso, embora os resultados demonstrem uma tendência ao menor ganho de peso nos grupos tratados, indicando que sua associação com a prática de exercícios físicos pode ter maiores benefícios.

No contexto da homeostase energética, o TAB corporal é, em roedores, distribuído em duas grandes reservas, a perigonadal e a perirrenal, reservas que podem ser afetadas pela OVX, dado o ganho de peso bem caracterizado neste grupo experimental. Além disso, o ganho de peso desses animais pode ter se originado também da redução do metabolismo basal (diminuição da atividade do TAM). Sabe-se que o TAM é um tecido que favorece o gasto energético, uma vez que realiza o desacoplamento mitocondrial da via de prótons da cadeia respiratória, favorecendo a produção de calor em detrimento da produção de ATP (Fernández-Verdejo *et al.*, 2019). Foi demonstrado que ratos OVX têm expressão reduzida de UCP1 no TAM, enquanto a expressão de UCP2 e UCP3 não muda. Uma redução na expressão de UCP2 também foi observada no TAB de ratos OVX. Essa redução na expressão de UCPs 1 e 2 em diferentes tipos de tecido pode ser um dos fatores responsáveis pela diminuição do gasto energético e consequente aumento da massa corporal neste modelo (Pedersen *et al.*, 2001). Assim, a redução do tamanho do TAM nos animais OVX indica menor gasto energético basal, efeito este que não foi afetado pelo tratamento com a Maca Vermelha.

Ainda sobre os efeitos da ovariectomia, a deficiência de estrogênio no organismo, promovida em ratas OVX, promove uma involução gradual do útero e,

consequentemente, uma redução do volume e massa uterina, levando à sua atrofia. Um estudo realizado por Zhou e colaboradores (2016), confirmou através de análise por microscopia eletrônica de transmissão, o aumento do número de vacúolos ligados à membrana, característicos de autofagossomos no citoplasma de células epiteliais uterinas (não células estromais) em ratas OVX 4 semanas após a operação, enquanto vacúolos ligados à membrana não foram encontrados no citoplasma de células epiteliais uterinas em ratas submetidas a cirurgia simulada. Análises adicionais indicaram a conversão de LC3-I em LC3-II, uma característica definidora da indução de autofagia, no endométrio uterino de maneira dependente do tempo após a OVX, demonstrando que a autofagia pode ser ativada no epitélio uterino após a retirada do estrogênio. Em nosso estudo, não observamos nenhum efeito da administração de Maca Vermelha sobre o índice uterino, contrariando estudo anterior com camundongos fêmeas OVX, que demonstrou resultados positivos com o uso de Maca Amarela, Vermelha e Preta para esse parâmetro (Rubio *et al.*, 2006).

Um estudo que investigou a associação entre adipocinas séricas e níveis séricos de estrogênio em mulheres saudáveis na pré e pós-menopausa descobriu que os níveis de TNF- α foram significativamente maiores após a menopausa, sugerindo que a deficiência de estrogênio resulta em aumento de citocinas inflamatórias séricas, o que pode contribuir para o desenvolvimento de aterosclerose e DM-2 (Purnamasari *et al.*, 2023). Um estudo com 200 mulheres mostrou que a síndrome metabólica foi diagnosticada em 16 % das mulheres na pré-menopausa e 42 % das mulheres na pós-menopausa. A circunferência da cintura foi elevada em 64 % das mulheres na pós-menopausa em comparação com 20 % do grupo mais jovem. Tanto a pressão arterial sistólica quanto a diastólica foram elevadas em mulheres na pós-menopausa. Além disso, os níveis de HDL foram menores e os níveis de TG foram maiores nesse grupo (Mehndiratta *et al.*, 2020). A Maca Vermelha em ratos hipercolesterolêmicos promoveu uma redução nos níveis séricos de TG e LDL (Večeřa *et al.*, 2007). Um estudo comparativo sobre a ação de três tipos de Maca (Preta, Vermelha e Amarela) na glicemia de ratos diabéticos demonstrou uma redução na glicemia após o consumo de todas as Macas investigadas (Qiu *et al.*, 2016).

Embora na pós-menopausa seja frequente o aparecimento de dislipidemia, independente de outros fatores, segundo Oliveira *et al.* (2008), e a Maca tenha

mostrado resultados positivos para esses parâmetros em estudos anteriores, em nosso estudo, não houve diferença significativa nos perfis lipídico e glicêmico entre os grupos experimentais.

Apesar de não termos associado o exercício físico ao protocolo, os resultados de lactato contrastam com os observados em um estudo que demonstrou que o tratamento com Maca em ratos promoveu uma resposta favorável do organismo a uma situação fisicamente exaustiva como a natação forçada. Nesse estudo, os animais tratados com Maca também apresentaram maiores níveis de SOD e menores níveis de CAT, lactato desidrogenase (LDH) e peroxidação lipídica (Suárez *et al.*, 2009). Assim, embora o tratamento com Maca Vermelha não tenha apresentado efeitos significativos no peso corporal, dentro do período analisado, é bem possível que ele afete de alguma forma o equilíbrio corporal entre os metabolismos oxidativo e glicolítico.

Além disso, em nosso estudo, os níveis séricos de cálcio total não apresentaram diferenças significativas entre os grupos, resultado semelhante ao publicado anteriormente por Zhang e colaboradores (2006), indicando que mecanismos homeostáticos foram capazes de manter os níveis séricos desse mineral apesar da OVX. Apesar de o cálcio ionizado ser a forma bioativa e ter a maior relação com o hormônio da paratireoide em humanos, a concentração de cálcio total no plasma ainda é a metodologia predominante, principalmente devido à sua disponibilidade e facilidade de medição (Hamroun *et al.*, 2020). Zhang e colaboradores, (2006), verificaram ainda que o extrato etanólico de Maca foi capaz de aumentar significativamente o conteúdo de cálcio no fêmur, a densidade mineral óssea das vértebras lombares (VL1-6) e a restauração do osso trabecular em ratas OVX, prevenindo a osteoporose neste modelo animal, sem aumentar o peso uterino, diferentemente do observado na terapia de reposição hormonal.

Com relação à saúde intestinal, os componentes da dieta podem alterar drasticamente sua fisiologia e regular principalmente a integridade de sua barreira (Chelakkot; Ghim; Ryu, 2018). A microbiota intestinal humana é composta principalmente por dois filos bacterianos, Firmicutes e Bacteroidetes, que representam mais de 90 % da comunidade total, e outros filos subdominantes, incluindo Proteobacteria, Actinobacteria e Verrucomicrobia. A alteração dessa proporção está relacionada ao desenvolvimento de disbiose intestinal, levando a efeitos deletérios à saúde do hospedeiro (Magne *et al.*, 2020). Após a menopausa a

alimentação se torna ainda mais importante, já que em idosos, a composição da microbiota apresenta diversidade reduzida com predominância de Proteobacteria e diminuição de Bifidobacterium (Biagi *et al.*, 2010).

Um estudo realizado por Sahin *et al* (2021), descobriu que a suplementação com extrato aquoso de Maca por 60 dias teve influência positiva na regulação de transportadores de peptídeos (Pept 1/2), transportadores de ácidos graxos (Fapt 1) e transportadores de glicose dependentes de glut (Glut 1/2) no jejuno e íleo de ratos. A função do jejuno é absorver monossacarídeos, aminoácidos e ácidos graxos, enquanto o íleo absorve os nutrientes restantes que não foram absorvidos pelo duodeno ou jejuno, especialmente vitamina B12 e ácidos biliares para serem reciclados. O tratamento com um composto contendo 30 % de Maca, associado a outras sete plantas medicinais em proporções menores, em camundongos submetidos ao teste do nado forçado, demonstrou, por meio do sequenciamento do rDNA 16S, regulação da microbiota intestinal por meio do aumento de bactérias benéficas como Lactobacillus e Akkermansia e redução de bactérias nocivas como Candidatus_Planktophilia e Candidatus_Arthromitus, sugerindo, neste estudo, melhora da fadiga induzida pelo exercício físico por meio do aumento do metabolismo energético de carboidratos, lipídios e aminoácidos (Zhu *et al.*, 2022).

Com base na análise filogenética do gene 16S rRNA, o filo Proteobacteria é dividido em 6 classes: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Zetaproteobacteria (Huttenhower *et al.*, 2012). Em nosso estudo, o grupo SHAM tratado com a Maca Vermelha mostrou uma redução significativa no conteúdo de Gamma DNA em comparação ao grupo controle, efeito que foi anulado pela OVX. Aumentos em Proteobacteria já foram observados em indivíduos ou animais obesos e resistentes à insulina (Rizzatti *et al.*, 2017).

Ademais, é clara na literatura a associação entre alterações no microbioma e mudanças comportamentais. Ao analisarmos os comportamentos do tipo depressivo e ansioso em ratos OVX ou SHAM, Machado e colaboradores (2021), observaram que ratas OVX apresentaram maior nível de ansiedade, em comparação aos ratos SHAM em testes comportamentais como o teste do labirinto em cruz elevado e nado forçado, corroborando os resultados obtidos em nosso estudo. No teste de campo aberto e reconhecimento de objetos, em ratas OVX, Renczés *et al.* (2020), descobriram que a remoção dos ovários foi capaz de provocar comportamentos

característicos de ansiedade nos animais.

Em modelos animais com síndrome metabólica, a suplementação de Maca foi capaz de melhorar sintomas semelhantes aos de ansiedade, além de reverter o comprometimento da memória, reduzir o estresse oxidativo e marcadores inflamatórios, quando comparado ao grupo controle. Em humanos, mulheres na menopausa suplementadas por 6 semanas com 3,5 g/dia de maca em pó apresentaram, ao final do tratamento, por meio de avaliação na escala climatérica de Greene, uma redução significativa nas escalas de sintomas psicológicos como ansiedade e depressão, quando comparado ao grupo controle (Brooks *et al.*, 2008). Resultados semelhantes foram descritos por Stojanovska *et al.* (2015), em que a suplementação de 3,3 g/dia de Maca por 12 semanas contribuiu para a redução dos sintomas de ansiedade e depressão e para a melhora da pressão arterial diastólica, em comparação ao grupo controle, resultados que reforçam os efeitos positivos da maca na saúde mental durante a menopausa e corroboram com nosso estudo onde a Maca Vermelha induziu a um efeito ansiolítico significativo em animais OVX.

A fim de investigar a capacidade imunológica do organismo, a massa do timo foi verificada. Camundongos imunossuprimidos com injeção intraperitoneal de ciclofosfamida, um agente quimioterápico comumente utilizado no tratamento de diversos tipos de câncer, foram observados após 14 dias de tratamento via gavagem com de extrato aquoso de Maca. Nesse estudo, os autores observaram prevenção da atrofia do baço e timo no grupo tratado com Maca, bem como a regulação da secreção de citocinas, efeito que foi atribuído principalmente aos polissacarídeos presentes na Maca, compostos de galactose, ramnose, arabinose, glicose, xilose, fucose, manose, entre outros (Fei *et al.*, 2022). Em nosso estudo o timo não apresentou diferença significativa de massa entre os grupos, no entanto, novas dosagens e tempo de tratamento devem ser futuramente explorados sobre a Maca.

8 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que, isoladamente, a OVX aumenta o ganho ponderal, reduz o índice uterino e a massa hipofisária, bem como diminuiu a massa do TAM, não interferindo na glicemia, nos lipídeos séricos, tampouco nos níveis de cálcio ou lactato plasmáticos.

O tratamento com Maca Vermelha não alterou a glicemia casual, o perfil lipídico plasmático e as concentrações de cálcio. A administração de Maca Vermelha também não preveniu as alterações induzidas pela OVX na massa corporal, no índice uterino e no tamanho relativo do TAM. No entanto, a Maca Vermelha preveniu a diminuição associada a OVX na massa relativa da hipófise, indicando um papel potencial no controle central da função gonadal, bem como induziu um efeito ansiolítico em animais OVX, mas não em animais SHAM, o que ocorreu em paralelo com alterações no perfil da microbiota intestinal.

Desta forma, a Maca Vermelha pode ser considerada um alimento funcional potencial para gerenciar alterações associadas ao hipoestrogenismo, especialmente na saúde intestinal e comportamental. No entanto, o uso mais prolongado deve ser avaliado por estudos futuros, a fim de validar os efeitos benéficos da Maca em marcadores metabólicos e bioquímicos.

REFERÊNCIAS

- ALAGIAKRISHNAN, Kannayiram; MORGADINHO, João; HALVERSON, Tyler. Approach to the diagnosis and management of dysbiosis. **Frontiers in Nutrition**, v. 11, p. 1330903, 2024.
- ALSHATWI, Ali *et al.* Tomato powder is more protective than lycopene supplement against lipid peroxidation in rats. **Nutrition Research**, New York, N.Y., v. 30, n. 1, p. 66–73, Jan. 2010.
- AMARYA, Shilpa; SINGH, Kalyani; SABHARWAL, Manisha. Ageing process and physiological changes. **Gerontology**, 4 July 2018. doi:10.5772/intechopen.76249.
- ANAGNOSTIS, Panagiotis *et al.* Menopause symptom management in women with dyslipidemias: An EMAS clinical guide. **Maturitas**, v. 135, p. 82–88, 1 May 2020.
- BÄCKHED, Fredrik *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718–15723, 2 Nov. 2004.
- BECKER, Sarah; MANSON, Joann. Menopause, the gut microbiome, and weight gain: correlation or causation? **Menopause**, New York, N.Y., v. 28, n. 3, p. 327–331, 23 Mar. 2020.
- BIAGI, Elena *et al.* Through ageing, and beyond: Gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, 2010.
- BOATENG, Jacob *et al.* Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 1541–1547, 1 Nov. 2008.
- BOWER-CARGILL, Cherie; YARANDI, Niousha; PETRÓCZI, Andrea. A systematic review of the versatile effects of the Peruvian Maca Root (*Lepidium meyenii*) on sexual dysfunction, menopausal symptoms and related conditions. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 4, p. 100326, 1 Nov. 2022.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1 Jan. 1995.
- BROOKS, Nicole *et al.* Beneficial effects of *Lepidium meyenii* (Maca) on psychological symptoms and measures of sexual dysfunction in postmenopausal women are not related to estrogen or androgen content. **Menopause**, New York, N.Y., v. 15, n. 6, p. 1157–1162, 2008.
- BROWN, Lydia *et al.* Promoting good mental health over the menopause transition. **Lancet**, London, England, v. 403, n. 10430, p. 969–983, 9 Mar. 2024.

BURCH, Kaitlin *et al.* Relationship between circulating metabolic hormones and their central receptors during ovariectomy-induced weight gain in rats. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 800266, 5 Jan. 2022.

CALLAN, Nini *et al.* Constipation and diarrhea during the menopause transition and early postmenopause: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study HHS Public Access. **Menopause**, v. 25, n. 6, p. 615–624, 2018.

CAMON, Celine; GARRATT, Michael; CORREA, Stephanie. Exploring the effects of estrogen deficiency and aging on organismal homeostasis during menopause. **Nature Aging**, v. 4, n. 12, p. 1731–1744, 13 Dec. 2024.

CAMPOS, David *et al.* Optimized methodology for the simultaneous extraction of glucosinolates, phenolic compounds and antioxidant capacity from maca (*Lepidium meyenii*). **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 747–754, 1 Aug. 2013.

CHAGAS, Luana *et al.* Anxiety-like behavior and neuroendocrine changes in offspring resulting from gestational post-traumatic stress disorder. **Behavioural Brain Research**, v. 399, 5 Feb. 2021.

CHANG, Jennifer; LEWIS, Meghan; WERTZ, Maggie. Managing menopausal symptoms: Common questions and answers. **American Family Physician**, v. 108, n. 1, p. 28–39, July 2023.

CHELAKKOT, Chaithanya; GHIM, Jaewang; RYU, Sung. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 50, n. 8, 1 Aug. 2018.

CHEN, Longfei; LI, Jieying; FAN, Liuping. The nutritional composition of maca in hypocotyls (*Lepidium meyenii* walp.) cultivated in different regions of China. **Journal of Food Quality**, v. 2017, 2017.

CHOI, Hye *et al.* Supplementation of standardized lipid-soluble extract from maca (*Lepidium meyenii*) increases swimming endurance capacity in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 2, p. 568–573, Apr. 2012.

CUNNIFF, Patricia. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International Arlington. **AOAC International**, v. 11, p. 6–7, 1995.

DA SILVA LEITÃO PERES, Natalia *et al.* Medicinal effects of Peruvian maca (*Lepidium meyenii*): a review. **Food & Function**, v. 11, n. 1, p. 83–92, 2020.

DAȔBROWSKA-GALAS, Magdalena *et al.* High Physical Activity Level May Reduce Menopausal Symptoms. **Medicina**, v. 55, n. 8, p. 466, 11 Aug. 2019.

DANTAS, Amanda. Almeida. Gomes *et al.* Prevalence and factors associated with constipation in premenopausal women: a community-based study. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 57, n. 2, p. 188–192, 1 Apr. 2020.

DELANEROLLE, Gayathri *et al.* Menopause: a global health and wellbeing issue that needs urgent attention. **The Lancet Global Health**, v. 13, n. 2, p. e196–e198, 1 Feb. 2025.

DELGOBO, Marina *et al.* N-acetylcysteine and alpha-lipoic acid improve antioxidant defenses and decrease oxidative stress, inflammation and serum lipid levels in ovariectomized rats via estrogen-independent mechanisms. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 67, p. 190–200, 1 May 2019.

DIAS, Celeste *et al.* Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. **Molecules**, v. 26, n. 17, p. 5377, 1 Sept. 2021.

DOKKEDAL-SILVA, Vinicius *et al.* The increasing popularity of Peruvian maca (*Lepidium meyenii*) and its potential impacts on sleep and quality of life. **Clinics**, v. 79, p. 100398, 22 July 2024.

EL KHOUDARY, Samar *et al.* Cardiovascular Fat, Menopause, and Sex Hormones in Women: The SWAN Cardiovascular Fat Ancillary Study. **The Journal of clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 100, n. 9, p. 3304–3312, 1 Sept. 2015.

EL KHOUDARY, Samar. Gaps, limitations and new insights on endogenous estrogen and follicle stimulating hormone as related to risk of cardiovascular disease in women traversing the menopause: A narrative review. **Maturitas**, v. 104, p. 44–53, 1 Oct. 2017.

ESSA, Musthafa. Mohamed *et al.* Functional foods and their impact on health. **Journal of Food Science and Technology**, v. 60, n. 3, p. 820, 1 Mar. 2021.

FEI, Na; ZHAO, Liping. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. **The ISME journal**, v. 7, n. 4, p. 880–884, Apr. 2013.

FEI, Wen. Ting *et al.* Immunomodulatory Effects of *Lepidium meyenii* Walp. Polysaccharides on an Immunosuppression Model Induced by Cyclophosphamide. **Journal of Immunology Research**, v. 2022, n. 1, p. 1210890, 1 Jan. 2022.

FENTON, Anna. Weight, Shape, and Body Composition Changes at Menopause. **Journal of Mid-Life Health**, v. 12, n. 3, p. 187, 1 July 2021.

FERNÁNDEZ-VERDEJO, Rodrigo *et al.* Contribution of brown adipose tissue to human energy metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 68, p. 82–89, 1 Aug. 2019.

FLORES, Roberto *et al.* Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study. **Journal of Translational Medicine**, v. 10, n. 1, 21 Dec. 2012.

FUHRMAN, Barbara *et al.* Associations of the fecal microbiome with urinary estrogens and estrogen metabolites in postmenopausal women. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 12, p. 4632–4640, 1 Dec. 2014.

- GAVIN, Kathleen *et al.* Modulation of energy expenditure by estrogens and exercise in women. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 46, n. 4, p. 232–239, 1 Oct. 2018.
- GINGOLD, Julian; JAIN, Meaghan; JALAI, Cyrus. Hypothalamic-pituitary-ovarian axis and control of the menstrual cycle. **Clinical Reproductive Medicine and Surgery: A Practical Guide**, Fourth Edition, p. 1–22, 1 Jan. 2022.
- GONZALES, Gustavo. Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 193496, 2011.
- HABEEB, S. Menopause: Transition, effects, and methods. **Encyclopedia of Sexual Psychology and Behavior**, p. 1–12, 2024. https://doi.org/10.1007/978-3-031-08956-5_1520-1.
- HAMROUN, Aghiles *et al.* Ionized calcium: analytical challenges and clinical relevance. **Journal of Laboratory and Precision Medicine**, v. 5, p. 22–22, July 2020.
- HONG, Cheol *et al.* Correlation between estrogens and serum adipocytokines in premenopausal and postmenopausal women. **Menopause**, New York, N.Y., v. 14, n. 5, p. 835–840, Sept. 2007.
- HU, Shiwan *et al.* Gut microbial beta-glucuronidase: a vital regulator in female estrogen metabolism. **Gut Microbes**, v. 15, n. 1, p. 2236749, 2023.
- HUTTENHOWER, Curtis *et al.* Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207–214, 14 June 2012.
- HWANG, Jeong *et al.* Daily walnut intake improves metabolic syndrome status and increases circulating adiponectin levels: randomized controlled crossover trial. **Nutrition Research and Practice**, v. 13, n. 2, p. 105, 1 Apr. 2019.
- JEHAN, Shazia *et al.* Sleep Disorders in Postmenopausal Women. **Journal of Sleep Disorders & Therapy**, v. 4, n. 5, p. 212, 2015.
- KAMEI, Yasutomi *et al.* Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 51, n. 2, p. 110–117, 2005.
- KIM, Ji *et al.* A systematic review and meta-analysis of effects of menopausal hormone therapy on cardiovascular diseases. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 20631, 26 Dec. 2020.
- KOVRT, Wendy; WIERMAN, Margaret. Preventing Fat Gain by Blocking Follicle-Stimulating Hormone. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 3, p. 293–295, 20 July 2017.

KRAVITZ, Howard; KAZLAUSKAITE, Rasa; JOFFE, Hadine. Sleep, Health, and Metabolism in Midlife Women and Menopause: Food for Thought. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 45, n. 4, p. 679–694, 1 Dec. 2018.

LEE, Yun; CHANG, Hyuk. Physicochemical and antioxidant properties of methanol extract from Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) leaves and roots. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 278–286, 2 May 2019.

LEIVA-REVILLA, Johanna *et al.* Effect of red maca (*Lepidium meyenii*) on INF- γ levels in ovariectomized rats. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v. 31, n. 4, p. 683–8, 2014.

LI, Cun *et al.* Treating menopause syndrome by kantai capsule and hormone replacement therapy: a meta-analysis of efficacy and safety comparison. **Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine**, v. 33, n. 9, p. 1183–1190, 1 Sept. 2013.

LIONETTI, Vincenzo *et al.* Importance of functional food compounds in cardioprotection through action on the epigenome. **European Heart Journal**, v. 40, n. 7, p. 575–582, 14 Feb. 2019.

MACHADO, Forcelini *et al.* Ginkgo biloba Extract (GbE) Restores Serotonin and Leptin Receptor Levels and Plays an Antioxidative Role in the Hippocampus of Ovariectomized Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 6, p. 2692–2703, 1 June 2021.

MAGNE, Fabien *et al.* The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? **Nutrients**, v. 12, n. 5, 1 May 2020.

MEEGASWATTE, Harshini *et al.* Functional Foods and Nutraceuticals for the Management of Cardiovascular Disease Risk in Postmenopausal Women. **Rev. Cardiovsc. Med.** **2024**, v. 25, n. 12, p. 460, 2024.

MEHNDIRATTA, Naina *et al.* A Prospective Study on the Incidence of Metabolic Syndrome in Premenopausal and Postmenopausal Women. **Journal of Mid-life Health**, v. 11, n. 1, p. 17–21, 1 Jan. 2020.

MEHTA, Jaya; KLING, Juliana; MANSON, Joann. E. Risks, benefits, and treatment modalities of menopausal hormone therapy: current concepts. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 564781, 26 Mar. 2021.

MINICH, Deanna *et al.* Not all maca is created equal: A review of colors, nutrition, phytochemicals, and clinical uses. **Nutrients**, v. 16, n. 4, p. 530, 1 Feb. 2024.

MONDUL, Alison *et al.* Age at Natural Menopause and Cause-specific Mortality. **American Journal of Epidemiology**, v. 162, n. 11, p. 1089–1097, 1 Dec. 2005.

NAPPI, Rossella *et al.* Menopause: a cardiometabolic transition. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 10, n. 6, p. 442–456, June 2022.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES. **Reproductive steroid hormones: synthesis, structure, and biochemistry. The clinical utility of compounded bioidentical hormone therapy.** Washington, DC: National Academies Press, 1 July 2020.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the care and use of laboratory animals.** 8th ed. Washington, DC: National Academies Press, 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/> doi: 10.17226/12910. Acesso em: 01 fev. 2025.

OLIVEIRA, Taciana *et al.* Factors associated with women's dyslipidemia in the post-menopause. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia**, v. 30, n. 12, Dec. 2008.

ORLOWSKI, Michelle; SARAO, Manbeer. Physiology, follicle stimulating hormone. **StatPearls**, 1 May 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535442/> Acesso em: 01 fev. 2025.

PACIUC, John. Hormone therapy in menopause. **Adv Exp Med Biol**, v. 1242, p. 89-120, 2020. doi:10.1007/978-3-030-38474-6_6. PMID:32406030.

PATEL, Sanjay *et al.* Association between reduced sleep and weight gain in women. **American Journal of Epidemiology**, v. 164, n. 10, p. 947–954, 2006.

PEDERSEN, Steen *et al.* Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 288, n. 1, p. 191–197, 19 Oct. 2001.

PERLMAN, Barry *et al.* The etiology of menopause: not just ovarian dysfunction but also a role for the central nervous system. **Global Reproductive Health**, v. 3, n. 2, p. e8–e8, June 2018.

PUGLIESE, Gabriella *et al.* Mediterranean diet as tool to manage obesity in menopause: A narrative review. **Nutrition**, Burbank, Los Angeles County, Calif., v. 79–80, 1 Nov. 2020.

PURNAMASARI, Dyah *et al.* Dysregulation of adipokines levels among healthy first-degree relatives of type 2 diabetes patients. **Heliyon**, v. 9, n. 8, p. e18887, 1 Aug. 2023.

QIU, Congyang *et al.* Analysis of Maceae and Macamide Contents of Petroleum Ether Extract of Black, Yellow, and Purple *Lepidium Meyenii* (Maca) and Their Antioxidant Effect on Diabetes Mellitus Rat Model. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 59, n. 0, 2016.

RENCZÉS, Emese *et al.* The Role of Estrogen in Anxiety-Like Behavior and Memory of Middle-Aged Female Rats. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, 7 Oct. 2020.

RETTBERG, Jamaica; YAO, Jia; BRINTON, Roberta. D. Estrogen: a master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 1, p. 8–30, Jan. 2014.

RIZZATTI *et al.* Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. **Biomed Res Int**, v. 17. 2017. doi: 10.1155/2017/9351507. PMID: 29230419; PMCID: PMC5688358.

RUBIO, Julio *et al.* Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii* (Maca) on learning and depression in ovariectomized mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 1, p. 23, 23 Dec. 2006.

SAHIN, Nurhan *et al.* Effects of maca (*Lepidium meyenii*) on nutrient digestibility and major nutrient transporters in rats fed a high-fat diet. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 10, p. 5765, 1 Oct. 2021.

SALPETER, Shelley *et al.* Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. **Diabetes, Obesity & Metabolism**, v. 8, n. 5, p. 538–554, 2006.

SANTORO, Nanette *et al.* The menopause transition: signs, symptoms, and management options. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 106, n. 1, p. 1–15, 1 Jan. 2021.

SANTOS, Guimarães *et al.* Compostos bioativos e capacidade antioxidante da Maca (*lepidium meyenii* walp) peruana: uma revisão bibliográfica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos: pesquisa e práticas contemporâneas**, v. 2, p. 383–399, 2021.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIÊNCIA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO. **Princípios éticos**. São Paulo, SP: SBCAL, [20--]. Disponível em: https://www.sbcal.org.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=65. Acesso em: 6 fev. 2025.

STOJANOVSKA, Lily *et al.* Maca reduces blood pressure and depression, in a pilot study in postmenopausal women. **Climacteric**, v. 18, n. 1, p. 69–78, 1 Feb. 2015.

SUÁREZ, Silvia *et al.* Extracto acuoso de *Lepidium meyenii* Walp (maca) y su papel como adaptógeno, en un modelo animal de resistencia física. **Anales de la Facultad de Medicina**, v. 70, n. 3, p. 181–185, 2009.

SUTTON-TYRRELL, Kim *et al.* Reproductive hormones and obesity: 9 years of observation from the study of women's health across the nation. **American Journal of Epidemiology**, v. 171, n. 11, p. 1203–1213, 1 June 2010.

TANG, Ruiyi *et al.* Relationships between vasomotor symptoms and mood in midlife urban chinese women: observations in a prospective study. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 105, n. 11, 1 Nov. 2020.

TEIXEIRA, Marques *et al.* Aplicações terapêuticas da *Lepidium meyenii* (Maca) e seus compostos químicos: Uma Revisão Sistemática. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 75883–75903, 7 Oct. 2020.

THAUNG ZAW, Jay Jay; HOWE, Peter Randal Charles; WONG, Raquel Heloise Xiwen. Postmenopausal health interventions: Time to move on from the Women's Health Initiative? **Ageing Research Reviews**, v. 48, p. 79–86, 1 Dec. 2018.

TRIPATHI, Shivani. Postmenopause: Physiological changes and role of functional foods for management of postmenopausal symptoms. **The Pharma Innovation Journal**, v. 11, n. 7, p. 3123–3130, 2022.

VALENTOVÁ, Katerina *et al.* Maca (*Lepidium meyenii*) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in combination with silymarin as food supplements: in vivo safety assessment. **Food and Chemical Toxicology an International Journal**, v. 46, n. 3, p. 1006–1013, Mar. 2008.

VALLE, F. P. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. **The American Journal of Psychology**, v. 83, n. 1, p. 103–111, 1970.

VEČEŘA, Rostislav *et al.* The influence of maca (*Lepidium meyenii*) on antioxidant status, lipid and glucose metabolism in rat. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, Netherlands, v. 62, n. 2, p. 59–63, 1 Jan. 2007.

WANG, Sunan; ZHU, Fan. Chemical composition and health effects of maca (*Lepidium meyenii*). **Food Chemistry**, v. 288, p. 422–443, 1 Aug. 2019.

WANG, Yali *et al.* Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions. **Food Research International**, v. 40, n. 7, p. 783–792, 1 Aug. 2007.

WANG, Yali *et al.* Administration of 17 β -estradiol to ovariectomized obese female mice reverses obesity-hypertension through an ACE2-dependent mechanism. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 308, n. 12, p. E1066, 15 June 2015.

WOO, Hae Dong; SHIN, Aesun; KIM, Jeongseon. Dietary patterns of Korean adults and the prevalence of metabolic syndrome: a cross-sectional study. **PloS one**, v. 9, n. 11, 3 Nov. 2014.

WU, Xiaoyan *et al.* Age at menarche and natural menopause and number of reproductive years in association with mortality: results from a median follow-up of 11.2 years among 31,955 naturally menopausal Chinese women. **PloS one**, v. 9, n. 8, 4 Aug. 2014.

YÁBAR, Emilio; CHIRINOS, Rosana; CAMPOS, David. Phenolic compounds and antioxidant capacity in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during pre-harvest, harvest and natural post-harvest drying. **Scientia Agropecuaria**, v. 10, n. 1, p. 85–97, 2019.

- YU, Lixia *et al.* Dietary lycopene supplementation improves cognitive performances in tau transgenic mice expressing P301L mutation via inhibiting oxidative stress and tau hyperphosphorylation. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 57, n. 2, p. 475–482, 2017.
- ZEVALLOS-CONCHA, A. *et al.* Effect of gamma irradiation on phenol content, antioxidant activity and biological activity of black maca and red maca extracts (*Lepidium meyenii* Walp). **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 26, n. 1, p. 67–73, 2 Jan. 2016.
- ZHANG, Feng-Qin; ZHANG, Hai-Zhu. The complete chloroplast genome sequence of the medicinal plant *Lepidium meyenii* Walp. (Cruciferae). **Mitochondrial DNA Part B: Resources**, v. 5, n. 3, p. 2945–2947, 2 July 2020.
- ZHANG, Hua; TSAO, Rong. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33–42, 1 Apr. 2016.
- ZHANG, Yongzhong *et al.* Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1–2, p. 274–279, Apr. 2006.
- ZHOU, Shengtao *et al.* Menopause-induced uterine epithelium atrophy results from arachidonic acid/prostaglandin E2 axis inhibition-mediated autophagic cell death. **Nature Publishing Group**, v. 6. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep31408>.
- ZHU, Hongkang. *et al.* Macamides: A review of structures, isolation, therapeutics and prospects. **Food Research International**, v. 138, p. 109819, 1 Dec. 2020.
- ZHU, Hongkang *et al.* Deciphering the potential role of Maca compounds prescription influencing gut microbiota in the management of exercise-induced fatigue by integrative genomic analysis. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 1004174, 12 Oct. 2022.

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO

Journal of Ethnopharmacology

Effects of Red Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) on behavioral, metabolic and biochemical parameters in ovariectomized rats

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Red Maca; hypoestrogenism; flavonoids; antioxidant effect; anxiolytic effect; gut microbiota.
Corresponding Author:	Silvia Graciela Ruginsk, PhD Federal University of Alfenas Alfenas, Minas Gerais BRAZIL
First Author:	Angela Maria Martins
Order of Authors:	Angela Maria Martins Luana Aparecida Chagas Leonardo Pereira de Araújo Leonardo Augusto de Almeida Olga Luisa Tavano Silvia Graciela Ruginsk, PhD
Abstract:	<p>Ethnopharmacology relevance: Maca has been widely used in complementary medicine to treat infertility, reduced libido and other menopause-associated symptoms. Aim of the study: The present study explored the influence of oral supplementation with Red Maca on behavioral, metabolic and biochemical indicators associated with hypoestrogenism.</p> <p>Material and methods: After acclimatization, female adult Wistar rats underwent ovariectomy (OVX) or sham surgery (SHAM). The animals were then treated by gavage with a Red Maca suspension (100 mg/kg/day) for 21 days. At the end of treatment, the animals were submitted to open field test and euthanized for tissue collection.</p> <p>Results: Neither OVX nor Red Maca administration altered casual glycemia, plasma lipid profile or calcium concentrations. Also, Red Maca treatment did not modify the OVX-induced alterations in body mass, uterine index or brown adipose tissue relative size. However, Red Maca prevented the OVX-associated decrease in pituitary relative mass, indicating a potential role in the central control of gonadal function. Red Maca also induced an anxiolytic effect on OVX, but not SHAM animals, which occurred in parallel with alterations of gut microbiota profile. The analysis of Red Maca composition revealed significant amounts of flavonoids, which may underlie important antioxidant activity, as demonstrated by in vitro radical scavenging assays.</p> <p>Conclusions: Red Maca appears as a potential nutraceutical to manage hypoestrogenism-associated alterations, particularly in behavior and intestinal health. However, the more prolonged use should be evaluated by future studies, in order to validate Maca beneficial effects on metabolic and biochemical markers.</p>

Cover letter



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas . Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700 . Alfenas/MG . CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas/MG/Brazil, March 17th, 2025.

To:

Dr. A.M. Viljoen, PhD

Editor-in-Chief

Journal of Ethnopharmacology

Dear Editor:

We would like to submit the manuscript entitled “Effects of Red Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) on behavioral, metabolic and biochemical parameters in ovariectomized rats” to be considered for publication as a research paper in the Journal of Ethnopharmacology. The authors state that they have approved the manuscript that is enclosed, and that the data has not been previously submitted for publication elsewhere, in whole or in part.

Sincerely yours,

A handwritten signature in black ink that reads 'Silvia Graciela Ruginsk'. The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Silvia Graciela Ruginsk (MSc, PhD) – Corresponding
author

Department of Physiological Sciences
Biomedical Sciences Institute
Federal University of Alfenas (Minas Gerais),
Brazil

Effects of Red Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) on behavioral, metabolic and biochemical parameters in ovariectomized rats

Martins AM, Chagas LA, Araújo LP, Almeida LA, Tavano OL, Ruginsk SG

- OVX or Maca did not alter glycemia, lipid profile or plasma calcium levels;
- Maca did not alter OVX-induced changes in body mass or brown adipose tissue size
- Maca prevented the OVX-induced effect on pituitary mass, but not in uterine index
- Maca induced anxiolytic effects on OVX rats and changed gut microbiota profile
- Maca is rich in flavonoids, demonstrating important *in vitro* antioxidant activity

1 Effects of Red Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) on behavioral, metabolic and 2 biochemical parameters in ovariectomized rats

3

4 Angela Maria Martins¹, Luana Aparecida Chagas¹, Leonardo Pereira de Araújo²,

5 Leonardo Augusto de Almeida², Olga Luisa Tavano³, Silvia Graciela Ruginsk⁴

6

7 ¹ Graduate Program in Biosciences applied to Health, Federal University of Alfenas,

8 Alfenas, Minas Gerais, Brazil

9 ² Laboratory of Molecular Biology of Microorganisms, Department of Microbiology and

10 Immunology, Biomedical Sciences Institute, Federal University of Alfenas, Alfenas, 11 Minas
Gerais, Brazil

12 ³ Faculty of Nutrition, Federal University of Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

- 13 ⁴ Department of Physiological Sciences, Biomedical Sciences Institute, Federal
14 University of Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brazil
15
- 16 Correspondence: Silvia Graciela Ruginsk
17 E-mails: silvia.leitao@unifal-mg.edu.br, sgrleitao@hotmail.com
- 18 Mailing address: Department of Physiological Sciences, Biomedical Sciences 19
Institute, Federal University of Alfenas, 700 Gabriel Monteiro da Silva Street, Alfenas,
20 State of Minas Gerais, Brazil. Zip code: 37130-001.
- 21 Telephone: +55(35)37019565

Abstract

Ethnopharmacology relevance: Maca has been widely used in complementary medicine to treat infertility, reduced libido and other menopause-associated symptoms.

Aim of the study: The present study explored the influence of oral supplementation with Red Maca on behavioral, metabolic and biochemical indicators associated with hypoestrogenism.

Material and methods: After acclimatization, female adult Wistar rats underwent ovariectomy (OVX) or sham surgery (SHAM). The animals were then treated by gavage with a Red Maca suspension (100 mg/kg/day) for 21 days. At the end of treatment, the animals were submitted to open field test and euthanized for tissue collection.

Results: Neither OVX nor Red Maca administration altered casual glycemia, plasma lipid profile or calcium concentrations. Also, Red Maca treatment did not modify the OVX-induced alterations in body mass, uterine index or brown adipose tissue relative size. However, Red Maca prevented the OVX-associated decrease in pituitary relative mass, indicating a potential role in the central control of gonadal function. Red Maca also induced an anxiolytic effect on OVX, but not SHAM animals, which occurred in parallel with alterations of gut microbiota profile. The analysis of Red Maca composition revealed significant amounts of flavonoids, which may underlie important antioxidant activity, as demonstrated by *in vitro* radical scavenging assays. **Conclusions:** Red Maca appears as a potential nutraceutical to manage hypoestrogenism-associated alterations, particularly in behavior and intestinal health. However, the more prolonged use should be evaluated by future studies, in order to validate Maca beneficial effects on metabolic and biochemical markers.

Keywords: *Lepidium meyenii* Walp; Ovariectomized rats; Metabolic; Biochemical parameters; Behavioral.

1. Introduction

Menopause is defined as the cessation of menstrual cycles, characterizing the end of the climacteric, a phase that comprises the transition between the reproductive and non-reproductive periods of a woman's life. As a result of population aging, more women will experience changes related to climacteric and menopause, which is why this phase of life deserves greater attention in the scope of public health and the search for alternative treatments (Delanerolle *et al.*, 2025).

During climacteric, there is a progressive decrease in the production of the ovarian hormones estrogen and progesterone (Habeb, 2024). These endocrine alterations have been associated with the development of dyslipidemia and increased cardiovascular risk (Camon *et al.*, 2024). In addition, during menopause there is a higher incidence of obesity, vasomotor, urogenital and psychological symptoms, reduced sexual performance (Sutton-Tyrrell *et al.*, 2010), hot flashes, vaginal alterations, changes in sexuality, osteoporosis, as well as mood and sleep disorders (Renczés *et al.*, 2020; Chang *et al.*, 2023). Gastrointestinal signs and symptoms are also common during and after menopause, and differences in metabolism and estrogen levels are known to be associated with intestinal microbial diversity (Hu *et al.*, 2023).

Within this context, hormone replacement therapy with estrogen is often reconsidered, not only due to important side effects, but also to several medical contraindications (Mehta *et al.*, 2021). Therefore, complementary treatments appear as important adjuvant tools to manage climacteric and menopause-associated symptoms. Indeed, the administration of Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) to ovariectomized rats (OVX), an animal model that mimics the hypoestrogenism found in menopausal women, improved trabecular bone restoration (Zhang *et al.*, 2006), induced a dose-dependent increase in interferon gamma (IFN- γ) levels, favoring innate immunity (Leiva-Revilla *et al.*, 2014), and also produced an antidepressant activity (Rubio *et al.*, 2006).

Maca is a cruciferous herb native to South America, growing exclusively above 3,500 m altitudes in the central Andes. The first taxonomic description dates back in 1843, and was originated from data collected in a village called Meyeni, in the Department of Puno, Peru (Zhang and Zhang, 2020). The hypocotyl of Maca is fused to

the root, forming a tuber that contains the reserve substances and the constituents to which the main properties have been attributed. With an appearance similar to a radish, it has a diverse coloration, ranging from yellow to black, characterizing thirteen different chemotypes (Minich *et al.*, 2024). Maca is rich in fibers, essential nutrients, and bioactive compounds such as isoflavones, quercetin, and anthocyanins (Santos *et al.*, 2021). Therefore, this plant has been part of the Peruvian culinary and medicinal tradition for hundreds of years, being widely used in complementary medicine to treat infertility, reduced libido, decreased physical vigor, memory disorders and menopausal symptoms (Teixeira *et al.*, 2020).

Considering its potential benefits, and also the important anthropological, ethnopharmacological, phytochemical and nutritional associated aspects (DokkedalSilva *et al.*, 2024), the present study aimed to explore the potential therapeutic use of Red Maca in the management of systemic manifestations in the experimental model of OVX-induced hypoestrogenism.

2. Material and methods

2.1 Animals

Sixty adult female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) of approximately six weeks (200g) were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas (UNIFAL/MG, Brazil). The animals were initially housed in collective plastic cages (4-5 animals per box) in the sectorial biotery of the Department of Physiological Sciences, in a room with controlled temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) and 12-hour light-dark cycle (lights on at 7 a.m.), with free access to standard rat chow and tap water. After acclimatization for 2-3 days, the animals were divided into ovariectomized (OVX) or SHAM-operated groups, and then transferred to individual cages, where they were kept throughout the experiment. For the study, a suspension of commercially obtained Red Maca flour (Color Andina Foods) was diluted in distilled water (vehicle) and administered by gavage (0.1 g/Kg/day), according to the manufacturer's instructions. Previously published studies employed Red Maca preparations in doses ranging from 0.096

g/kg/day (Zhang *et al.*, 2006) to 1 g/kg/day (RUBIO *et al.*, 2006), supporting the current choice. The solution was prepared daily and remained under constant agitation for administration. It has been previously demonstrated that the efficacy of aqueous Maca extracts improved after boiling, suggesting that heat facilitates the extraction of secondary metabolites (Gonzales, 2011). In the present study, however, the preparation of Red Maca suspension for oral administration was carried out without heating, since this procedure was not indicated by the manufacturer's instructions. During the experiment, the animals' body mass was measured daily, always at the same time of day, and the suspension volume was adjusted. All the procedures were conducted in accordance with the ethical principles of the Brazilian Society of Science in Laboratory Animals and were approved by the Animal Research Ethics Committee (CEUA) of UNIFAL/MG (protocol n° 005/2022).

2.2. Bilateral ovariectomy or sham surgery

The rats were anesthetized with a mixture of xylazine hydrochloride (10 mg/kg) and ketamine hydrochloride (90 mg/kg), in a volume of 0.1 mL of solution for 100 g of body mass. Briefly, in the ovariectomized (OVX) animals, the ovaries were located, exposed and excised, and the muscle and skin layers were sutured bilaterally. As a surgical control, a group of animals underwent sham surgery (SHAM), in which the ovaries were not removed, only moved out of the cavity, to simulate the same procedure. In the postoperative period, the animals received analgesia with Flunixin meglumine (Banamine®, 2.5 mg/kg, subcutaneously, every 12 hours, for 3 consecutive days) and Tramadol (12.5 mg/kg, subcutaneously, every 8 hours, for 36 hours). The animals also received a prophylactic dose of pentabiotic for small animals (Fort Dodge□, 1 mL/Kg, intramuscularly).

2.3. Serum analyses

After 21 consecutive days of treatment with Red Maca or vehicle, the animals were euthanized with a lethal dose of inhalatory anesthetic (isoflurane), and tissues were

removed or processed for the respective analyses. Truncal blood was collected into heparinized tubes and centrifuged for 20 minutes at 3,000 rpm at 4°C. Plasma samples were used to determine casual glycemia, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and total calcium concentrations, using commercially available colorimetric assays (Interkit).

2.4. Evaluation of behavior and locomotor activity in the open field test

For this test, we used a round arena with a white floor, divided into 12 quadrants, with a 0.39 m transparent wall around the periphery. The test was carried out in a small, windowless and noiseless room, with controlled lighting and temperature. The animals were acclimated to the apparatus one day before, for 10 minutes and, in the test day, they were placed individually in the center of the arena and filmed for 10 minutes. Subsequently, the time spent in the center or periphery of the apparatus (in seconds) was calculated by 2 independent researches, blind to the experimental conditions. After each test, the apparatus was cleaned with 10% alcohol (CHAGAS *et al.*, 2021).

2.5. Analysis of the intestinal microbiota by real-time PCR

After euthanasia, a sample of cecal content was also collect to determine the intestinal microbiota profile by real-time PCR. For this purpose, samples of 5 animals of each experimental group were collected aseptically in pools (one for each experimental group). The total DNA was extracted from faecal pellets according to data from the manufacturer of the PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Thermo Fischer Scientific, Van Allen Way Carlsbad, CA, USA). The total DNA was purified on a Invitrogen spin column and quantified using an Invitrogen Qubit Fluorometer (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). An amount of 15 ng of total DNA was used to analyze 16S ribosomal RNA (rRNA) genes per well, using the specific primers for total bacteria, Bacteroidetes, Firmicutes or Gammaproteobacteria as follows: Total bacteria F 5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' , Total bacteria R

5' -AAGGAGGTGWTCCARCC-3' ,	Bacteroidetes	F	5' -
GTTTAATTCGATGATACGCGAG-3' ,	Bacteroidetes	R	5' -
TTAASCCGACACCTCACGG-3' ,	Gammaproteobacteria	F	5' -
GCTAACGCATTAAGTRYCCCG-3' ,	Gammaproteobacteria	R	5' -
GCCATGCRGCACCTGTCT-3' ,	Firmicutes	F	5' -
GGAGYATGTGGTTTAATTCGAAGCA-3' ,	Firmicutes	R	5' -
AGCTGACGACAACCATGCAC-3' .	Real-time qPCR was conducted in a final		

volume of 10 µL containing the following: SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), DNA as the PCR template, and 20 µM of primers. The PCR reaction was performed with ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), using the following cycling parameters: 60°C for 10 min, 95°C for 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 sec, and 60°C for 1 min, and a dissociation stage of 95°C for 15 sec, 60°C for 1 min, 95°C for 15 sec, 60°C for 15 sec. qPCR measurements were conducted in triplicate and data were presented as arbitrary units relative to SHAM Control group.

2.6. Determination of centesimal composition of Red Maca flour

The centesimal composition (moisture, ashes and lipids) was performed according to the proposal of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). The moisture content was performed based on the gravimetric determination of volatiles at 105 °C, in an oven with forced air circulation, until constant weight was achieved. The ash content was determined as fixed mineral residue, by gravimetry, using a muffle furnace at 550 °C, until constant weight was obtained. The lipid content was determined using the Soxhlet method, by continuous extraction with petroleum ether solvent (Cunniff, 1995). The protein content was determined by quantifying total nitrogen by the Kjeldahl method, as previously described (AOAC), using a 6.25 factor conversion. Total carbohydrates were calculated from the NIFEXT fraction, subtracting the sum of the other components from 100g of sample (Cunniff, 1995).

2.7. Preparation of methanolic Red Maca extract for determination of total phenolic content and total flavonoids

The Red Maca flour samples underwent extraction in methanol (80%), in a ratio of 1:20, originating 3 replicates, based on the methodology proposed by Lee and Chang (2019). After shaking for 24 hours, the samples were centrifuged at 3,000 rpm for 5 minutes, and stored at - 10°C until the analyses were performed. All the assays were performed in triplicate. Total phenolic content determination was performed as previously described (Boateng *et al.*, 2008). Reading was obtained at 750 nm, using Folin–Ciocalteu reagent and the gallic acid curve as standard. The results were expressed in Gallic Acid Equivalents (GAE)/g of sample. Determination of total flavonoids in the Red Maca methanolic extract was also performed using the method previously proposed by Boateng *et al* (2008). Reading was obtained at 517 nm, using a catechin standard curve as reference. The results were expressed in catechin equivalents (CE)/g of sample.

2.8. Determination of Red Maca antioxidant potential by by DPPH and ABTS⁺ radical scavenging

The determination of the antioxidant potential of Red Maca extracts was performed as proposed by Brand-Williams *et al* (1995), with reading at 517 nm for DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) and 734 nm for the ABTS⁺ [2,2'-Azino-Bis(3Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) Diammonium Salt] assay. For calculation purposes, an analytical curve of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2Carboxylic Acid) was used in the concentration range of 0 to 7 nmol of Trolox, and the results were expressed in μmol of Trolox equivalent (TE)/g of sample.

2.9. Statistical analyses

The data obtained were expressed as mean \pm standard error (SE). Analysis of

variance (ANOVA), followed by the Sidak's posthoc teste were used to compare the means between the different groups. Differences were considered significant when $p < 0.05$ (bicaudal). All statistical analyses were performed using GraphPad InStat statistical software, version 3.05, for Windows (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. Effects of Red Maca on metabolic and biochemical parameters in SHAM and OVX animals

The OVX groups, regardless of Red Maca treatment, exhibited a greater body mass variation, when compared to the respective SHAM group [$F(1, 30) = 25.24$, $p < 0.001$, Figure 1A]. As expected, OVX also induced a significant reduction in uterine mass [$F(1, 30) = 158.50$, $p < 0.001$, Figure 1B], an effect that was also not affected by Red Maca treatment. We also detected a significant reduction in the pituitary relative mass in vehicle-treated OVX animals [$F(1, 30) = 10.77$, $p < 0.01$, Figure 1C], being this effect prevented in animals administered with Red Maca. Finally, Figure 1D shows that OVX significantly decreased the relative mass of brown adipose tissue

(BAT), regardless of Red Maca treatment [$F(1, 30) = 12.31$, $p < 0.01$]. According to Table 1, casual blood glucose levels did not vary among the experimental groups. Also, in the present study, serum levels of TG, TC and total calcium were not altered in response to OVX or Red Maca treatment.

3.2. Effects of Red Maca on behavioral parameters in SHAM and OVX animals

According to the open field test results, no differences were found in the times spent in the center or periphery between SHAM and OVX animals treated with vehicle (Figures 2A and 2B). On the other hand, OVX rats treated with Red Maca showed

increased permanence in the center of the apparatus, either when compared to Control OVX group or to Maca-treated SHAM animals (Figure 2A). Therefore, statistically relevant effects on this parameter were found for Red Maca treatment [$F(1, 13) = 8.61$, $p < 0.05$], and also for the interaction between treatment and gonadal function [$F(1, 13) = 8.28$, $p < 0.05$]. Consequently, treatment with Red Maca decreased the permanence of OVX rats in the periphery, either when compared to Control OVX animals or to the treated SHAM group (Figure 2B). However, under the statistical point of view, only Maca treatment showed a significant effect on this parameter [$F(1, 13) = 11.89$, $p < 0.01$]. No significant changes were induced by OVX or Red Maca treatment on the time of mobility (Figure 2C) and immobility (Figure 2D).

3.3. Effects of Red Maca on gut microbiota profile in SHAM and OVX animals

According to Figure 3, the Bacteroidetes and Firmicutes DNA contents did not show any significant changes in response to OVX or Red Maca administration. However, a significant reduction in the Gamma bacteria DNA was observed in SHAM, but not in OVX animals treated with Red Maca (Figure 3D), showing a statistically relevant effect of treatment [$F(1, 7) = 6.57$, $p < 0.05$], and also of the interaction between treatment and gonadal function [$F(1, 7) = 6.08$, $p < 0.05$]. The decreased Gamma bacteria population probably determined a reduction of total bacterial DNA content in the same group (Figure 3A). Therefore, total bacterial population was significantly impacted by OVX [$F(1, 8) = 38.42$, $p < 0.001$], Red Maca administration [$F(1, 8) = 37.05$, $p < 0.001$] and also by the interaction between the two variables [$F(1, 8) = 23.02$, $p < 0.01$].

3.4. Determination of Red Maca flour main components

The centesimal composition of the Red Maca is detailed in Table 2. According to the results, total carbohydrates (including fibers) account for approximately 70% of the

sample, followed by proteins (~12%) and lipids (~2%). The results demonstrate that phenols represent around 6 mg of GAE/g of sample, whereas flavonoids account for less than 1 mg of CE/g of sample.

3.5. Determination of Red Maca antioxidant potential

Radical scavenging is often used to evaluate the antioxidant activity of natural products, which occurs through their ability to donate hydrogen to free radicals, converting them into non-toxic species and inhibiting lipid oxidation (Lee & Chang, 2019). The antioxidant performance of Red Maca in the DPPH and ABTS⁺ assays is shown in Table 4.

4. Discussion

It is well established that estrogen deficiency promotes a gradual, time-dependent involution of the uterus and, consequently, a reduction in uterine volume and mass, leading to its atrophy. Several events may underlie this effect, including the hypoestrogenism-induced increase in autophagy in the uterine epithelium (Zhou *et al.*, 2016). In addition to the menopause-induced effects on target organs, gonadotropin production is initially increased in OVX animals, reducing over time due to the absence of the negative feedback mechanism. Although we did not measure plasma 17 β -estradiol or gonadotrophins concentrations, the significant reduction in pituitary mass observed in control OVX animals strongly suggests that the gonadal axis may be completely inhibited after 3 weeks.

Also, it has also been extensively demonstrated in the literature that OVX accelerates body mass accumulation in rodents. A reduction in the expression of leptin receptors in the hypothalamus has been associated to the OVX-induced decrease in satiety (Burch *et al.*, 2022). Previous studies have also demonstrated that estrogen deficiency is associated with transient hyperphagia and reduced spontaneous activity, changes that were reversed by estrogen replacement (Gavin *et al.*, 2018).

In OVX mice, a decreased expression of nuclear receptors and proteins required for efficient energy expenditure has also been reported. OVX mice also exhibited decreased expression of enzymes involved in fatty acid β -oxidation and transcription factors required for lipolysis (Kamei *et al.*, 2005). Indeed, sex steroids appear to regulate the expression of mitochondrial uncoupling proteins (UCP) in white and brown adipose tissue depots, since OVX rats exhibited reduced expression of UCP1 in BAT (Pedersen *et al.*, 2001). In the present study, OVX animals showed not only a greater body mass variation, but also a reduction in BAT size, also supporting the hypothesis that the hypoestrogenism-induced obesogenic effect may be, at least in part, derived from reduced basal metabolism and thermogenic activity. We also demonstrated that a 3-week OVX protocol did not produce a significant effect on the main biochemical indicators of lipid metabolism, calcium balance or glucose homeostasis, as shown in Table 1. However, a study performed in healthy women found that proinflammatory cytokines are significantly higher after menopause, what may contribute to the development of atherosclerosis and type 2 *diabetes mellitus* (Purnamasari *et al.*, 2023). Indeed, the metabolic syndrome was diagnosed in 42% of postmenopausal women, which also showed higher blood pressure and TG levels, in parallel with lower HDL plasma concentrations

(Mehndiratta *et al.*, 2020).

Also, bone health is a critical issue for post-menopausal risk. Although ionized calcium is the bioactive form and has the greatest relationship with parathyroid hormone in humans, the concentration of total calcium in plasma is still the predominant methodology, mainly due to its availability and easy assessment (Hamroun *et al.*, 2020). Again, in our study, no important alterations in total calcium levels were found in OVX animals, corroborating previous findings (Zhang *et al.*, 2006). Although the present experimental protocol failed to characterize these important menopause-associated features, we believe that the time window of evaluations may constitute a critical issue in this case, since there is strong evidence that most of the menopause alterations exhibit a time-dependent profile.

Within this context, the present study proposed the use Red Maca as a potential adjuvant intervention to decrease OVX-induced alterations. The centesimal composition of the Red Maca (Table 2) revealed similar carbohydrate content to previously reported

results, with values ranging from 50 to 70%. The lipid content was also similar in wet (2%) and dry matter (4%), as previously described (Valentová *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2017).

Most studies demonstrating the health-related properties of Maca were performed with aqueous or hydroalcoholic extracts, being the effects mostly attributed to glucosinolates, polyphenols and antioxidants (Wang and Zhu, 2019). Maca is also rich in micronutrients such as vitamin C, copper and iron, as well as in bioactive compounds, such as isoflavones, quercetin and anthocyanins (Silva Leitão Peres *et al.*, 2020). In the present study, the total phenolic content was below the values found by other authors using mixed flour of yellow, red and black Maca, and also the hydroalcoholic extract of red Maca (8.99 to 11.6 mg/g), respectively (Campos *et al.*, 2013; Zevallos-Concha *et al.*, 2016). On the other hand, the total flavonoid content was considerably higher than the one reported for Red Maca methanolic extract (Lee and Chang, 2019).

As previously demonstrated, high levels of flavonoids increase the ability to eliminate free radicals, contributing to antioxidant activity (Dias *et al.*, 2021). Within this context, DPPH radical scavenging is often used to evaluate the antioxidant activity of natural products, which occurs through the ability to donate hydrogen to free radicals, converting them into non-toxic species and inhibiting lipid oxidation. Methanolic extracts of Maca leaves and roots showed a positive effect on this parameter, with leaves demonstrating the greater effect (Lee and Chang, 2019). Also, the antioxidant potential assessed by the ABTS⁺ method was investigated in three

Maca genotypes (yellow, red, black), with the better results being obtained in Red Maca, corroborating the present findings (Yábar, Chirinos & Campos, 2019).

In sedentary animals, Red Maca was able to prevent weight gain and, when associated with physical activity, enhanced weight loss (Choi *et al.*, 2012). In our study, however, we did not observe alteration in weight gain or BAT size in Red-Maca treated animals, indicating that its association with physical exercises may potentiate its eventual beneficial effects on body metabolism. We also did not observe any effect of Red Maca administration on the uterine index, contradicting a previous study with female OVX mice, which demonstrated positive results with the use of Yellow, Red and Black Maca for this parameter (Rubio *et al.*, 2006). However, the present findings demonstrated that treatment with Red Maca prevented the reduction in pituitary mass in

the OVX group, since the statistical effect of surgery was abolished, indicating that Maca treatment could act at the nervous system to control gonadal function. In this regard, the literature suggests that the Maca effects on hormonal balance may be related to the presence of alkaloids, such as berberine and norzoantamine, which act on the hypothalamic-pituitary axis and the adrenal glands (Wang *et al.*, 2007). Additionally, Maca also contains steroid-like substances, which potentially increase blood testosterone and progesterone levels in rats (Bower-Cargill *et al.*, 2022).

Regarding biochemical profile, it has been previously reported a Red Maca-induced reduction in serum TG and LDL levels in hypercholesterolemic rats (Večeřa *et al.*, 2007). There is also evidence in the literature that all the three types of Maca (Black, Red and Yellow) significantly reduce plasma glucose levels in diabetic rats, contradicting the present findings in normoglycemic animals (Qiu *et al.*, 2016). In relation to bone health, the ethanolic extract of Maca has been shown to significantly increase femur calcium content and bone mineral density of lumbar vertebrae (VL16), as well as to restore trabecular bone structure in OVX rats (Zhang *et al.*, 2006). Interestingly, these authors also demonstrated that Maca treatment was effective in preventing osteoporosis in the OVX model, even with no detectable alterations in plasma calcium concentrations, as also demonstrated by the present findings. Also, Maca itself contains a lot of calcium, magnesium and a good amount of silica, which are useful in replacing menopause-associated bone calcium loss (Minich *et al.*, 2024).

Considering the important interplay between metabolism, inflammation and sex steroids, the intestinal physiology and the regulation of its integrity has recently appeared as a key factor (Chelakkot, Ghim & Ryu, 2018). In humans, the intestinal microbiota is mainly composed of two bacterial phyla, Firmicutes and Bacteroidetes, which represent more than 90% of the total community. Based on phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, the phylum Proteobacteria is divided into 6 classes that include Gammaproteobacteria (Huttenhower *et al.*, 2012). Increases in Proteobacteria were also reported in obese and insulin-resistant individuals or animals (Rizzatti *et al.*, 2017). In the present study, the gut microbiota profile was not altered by OVX itself, but OVX animals were resistant to Red Maca-induced decrease in Gamma bacteria population. In this regard, treatment with a compound containing 30% Maca, associated with seven other medicinal plants in smaller proportions, in mice subjected to the forced swimming test, demonstrated through 16S rDNA sequencing, regulation of the intestinal microbiota

through the increase of beneficial bacteria (Zhu *et al.*, 2022).

Alterations in the homeostatic proportion of different bacteria have been already reported to induce intestinal dysbiosis, leading to deleterious effects on host health (Magne *et al.*, 2020). This is based in the evidence that the gut-brain axis plays a fundamental role in behavioral control, interfering with important outcomes that determine the development of neurodegenerative diseases. Indeed, the microbiota composition of elderly individuals presents reduced diversity, decisively impacting in the response of the central nervous system to challenges (Biagi *et al.*, 2010).

In the present study, Red Maca induced a significant anxiolytic effect in OVX, but not SHAM animals. As discussed previously, these behavioral alterations occurred in parallel to the changes in microbiota profile of the same experimental groups. The present findings contradict previous reports showing that OVX rats presented a higher level of anxiety (Machado *et al.*, 2021, Renczés *et al.*, 2020). However, the present results confirm data obtained in menopausal women supplemented for 6 weeks with 3.5g/day of Maca powder, who exhibited a significant reduction in psychological symptoms such as anxiety and depression (Brooks *et al.*, 2008). Similar results were obtained by Stojanovska *et al.* (2015), who showed that supplementation with 3.3g/day of Maca for 12 weeks contributed to the reduction of anxiety and depression, as well as improved diastolic blood pressure.

In conclusion, the present study proposes Red Maca as a potential nutraceutical to manage hypoestrogenism-induced alterations, particularly in behavior and intestinal health. However, despite the promising antioxidant performance shown by Red Maca in *in vitro* assays, the present data could not completely characterize the OVX model as fully representative of menopause-associated changes in glucose metabolism and lipid profile, probably due to the temporal window of evaluation. Therefore, the long term use of Red Maca should be evaluated by future studies, in order to validate its beneficial effects on metabolic and biochemical markers of hypoestrogenism.

Funding

Not applicable.

Credit authorship contribution statement

Angela Maria Martins: Conceptualization, Investigation, Data curation, Project administration, Writing– review & editing, Writing– original draft

Luana Aparecida Chagas: Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing– original draft

Leonardo Pereira de Araújo, Leonardo Augusto de Almeida and Olga Luisa Tavano: Methodology, Validation, Formal analysis

Silvia Graciela Ruginsk: Formal analysis, Supervision, Project administration, Writing– review & editing, Writing– original draft

Declaration of competing interest

The authors declare that no competing interests exist.

Data availability

All relevant data are within the paper, but further information can be provided by the correspondent author under request.

Figure captions

Figure 1 – Body mass variation (g), uterine index (mg/100 g of body mass, b.m.), pituitary relative mass (mg/100 g of b.m.) and brown adipose tissue relative mass (mg/100 g of b.m.) in SHAM (white bars) or OVX animals (grey bars) treated by gavage with vehicle (Control) or Red Maca suspension (100mg/kg/day) for 21 days.

Results are expressed as mean \pm standard error (SE) and were analysed by TwoWay ANOVA, followed by Sidak's post-test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Figure 2 – Time spent in the center (in seconds, 3A), time spent in the periphery (in seconds, 3B), time of mobility (in seconds, 3C) and time of immobility (in seconds, 3D) in SHAM (white bars) or OVX animals (grey bars) treated by gavage with vehicle

(Control) or Red Maca suspension (100mg/kg/day) for 21 days and submitted to the open field test. Results are expressed as mean \pm standard error (SE) and were analyzed by Two-Way ANOVA, followed by Sidak's post-test. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

Figure 3 – Total bacterial DNA (in $2^{-\Delta Ct}$, 2A), Bacteroidetes DNA (in $2^{-\Delta Ct}$, 2B), Firmicutes DNA (in $2^{-\Delta Ct}$, 2C) and Gammabacteria DNA (in $2^{-\Delta Ct}$, 2D) in fecal samples obtained from SHAM (white bars) or OVX animals (grey bars) treated by gavage with vehicle (Control) or Red Maca suspension (100mg/kg/day) for 21 days. Results are expressed as mean \pm standard error (SE) and were analyzed by Two-Way ANOVA, followed by Sidak's post-test. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$.

References

ANIMALS, N. R. C. (US) C. FOR THE U. OF THE G. FOR THE C. AND U. OF L. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 27 Dec. 2011.

BIAGI, E. *et al.* Through ageing, and beyond: Gut microbiota and inflammatory status in seniors and centenarians. PLoS ONE, v. 5, n. 5, 2010.

BOATENG, J. *et al.* Effect of processing on antioxidant contents in selected dry beans (*Phaseolus* spp. L.). LWT - Food Science and Technology, v. 41, n. 9, p. 1541–1547, 1 Nov. 2008.

BOWER-CARGILL, C.; YARANDI, N.; PETRÓCZI, A. A systematic review of the versatile effects of the Peruvian Maca Root (*Lepidium meyenii*) on sexual dysfunction, menopausal symptoms and related conditions. Phytomedicine Plus, v. 2, n. 4, p. 100326, 1 Nov. 2022.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1 Jan. 1995.

BURCH, K. E. *et al.* Relationship Between Circulating Metabolic Hormones and Their Central Receptors During Ovariectomy-Induced Weight Gain in Rats. *Frontiers in Physiology*, v. 12, p. 800266, 5 Jan. 2022.

CAMON, C.; GARRATT, M.; CORREA, S. M. Exploring the effects of estrogen deficiency and aging on organismal homeostasis during menopause. *Nature aging*, v. 4, n. 12, p. 1731, 1 Dec. 2024a.

CAMON, C.; GARRATT, M.; CORREA, S. M. Exploring the effects of estrogen deficiency and aging on organismal homeostasis during menopause. *Nature Aging* 2024 4:12, v. 4, n. 12, p. 1731–1744, 13 Dec. 2024b.

CAMPOS, D. *et al.* Optimized methodology for the simultaneous extraction of glucosinolates, phenolic compounds and antioxidant capacity from maca (*Lepidium meyenii*). *Industrial Crops and Products*, v. 49, p. 747–754, 1 Aug. 2013.

CHAGAS, L. A. *et al.* Anxiety-like behavior and neuroendocrine changes in offspring resulting from gestational post-traumatic stress disorder. *Behavioural brain research*, v. 399, 5 Feb. 2021.

CHANG, J. G.; LEWIS, M. N.; WERTZ, M. C. Managing Menopausal Symptoms: Common Questions and Answers. *American Family Physician*, v. 108, n. 1, p. 28–39, July. 2023.

CHELAKKOT, C.; GHIM, J.; RYU, S. H. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Experimental & molecular medicine*, v. 50, n. 8, 1 Aug. 2018.

CHEN, L.; LI, J.; FAN, L. The nutritional composition of maca in hypocotyls (*Lepidium meyenii* walp.) cultivated in different regions of China. *Journal of Food Quality*, v. 2017, 2017.

CHOI, E. H. *et al.* Supplementation of standardized lipid-soluble extract from maca (*Lepidium meyenii*) increases swimming endurance capacity in rats. *Journal of Functional Foods*, v. 4, n. 2, p. 568–573, Apr. 2012.

CUNNIFF P. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International Arlington. *AOAC International*, v. 11, p. 6–7, 1995.

DA SILVA LEITÃO PERES, N. *et al.* Medicinal effects of Peruvian maca (*Lepidium meyenii*): a review. *Food & Function*, v. 11, n. 1, p. 83–92, 2020.

DELANEROLLE, G. *et al.* Menopause: a global health and wellbeing issue that needs urgent attention. *The Lancet Global Health*, v. 13, n. 2, p. e196–e198, 1 Feb. 2025.

DIAS, M. C. *et al.* Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity. *Molecules*, v. 26, n. 17, p. 5377, 1 Sept. 2021.

DOKKEDAL-SILVA, V. *et al.* The increasing popularity of Peruvian maca (*Lepidium meyenii*) and its potential impacts on sleep and quality of life. *Clinics*, v. 79, p. 100398, 22 July. 2024.

GAVIN, K. M. *et al.* Modulation of Energy Expenditure by Estrogens and Exercise in Women. *Exercise and sport sciences reviews*, v. 46, n. 4, p. 232–239, 1 Oct. 2018.

GONZALES, G. F. Ethnobiology and Ethnopharmacology of *Lepidium meyenii* (Maca), a Plant from the Peruvian Highlands. *Evidence-based Complementary and*

Alternative Medicine : eCAM, v. 2012, p. 193496, 2011.

HABEEB, S. Menopause: Transition, Effects, and Methods. Encyclopedia of Sexual Psychology and Behavior, p. 1–12, 2024.

HAMROUN, A. *et al.* Ionized calcium: analytical challenges and clinical relevance. Journal of Laboratory and Precision Medicine, v. 5, p. 22–22, July. 2020.

HU, S. *et al.* Gut microbial beta-glucuronidase: a vital regulator in female estrogen metabolism. Gut Microbes, v. 15, n. 1, p. 2236749, 2023.

KAMEI, Y. *et al.* Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat. Journal of nutritional science and vitaminology, v. 51, n. 2, p. 110–117, 2005.

LEE, Y. K.; CHANG, Y. H. Physicochemical and antioxidant properties of methanol extract from Maca (*Lepidium meyenii* walp.) leaves and roots. Food Science and Technology (Brazil), v. 39, p. 278–286, 1 June. 2019.

LEIVA-REVILLA, J. *et al.* [Effect of red maca (*Lepidium meyenii*) on INF- γ levels in ovariectomized rats]. Revista peruana de medicina experimental y salud publica, v. 31, n. 4, p. 683–8, 2014.

MACHADO, M. M. F. *et al.* Ginkgo biloba Extract (GbE) Restores Serotonin and Leptin Receptor Levels and Plays an Antioxidative Role in the Hippocampus of Ovariectomized Rats. Molecular neurobiology, v. 58, n. 6, p. 2692–2703, 1 June. 2021.

MAGNE, F. *et al.* The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? Nutrients, v. 12, n. 5, 1 May 2020.

MEHNDIRATTA, N. *et al.* A Prospective Study on the Incidence of Metabolic Syndrome in Premenopausal and Postmenopausal Women. Journal of mid-life health, v.

11, n. 1, p. 17–21, 1 Jan. 2020.

MEHTA, J.; KLING, J. M.; MANSON, J. A. E. Risks, Benefits, and Treatment Modalities of Menopausal Hormone Therapy: Current Concepts. *Frontiers in Endocrinology*, v. 12, p. 564781, 26 Mar. 2021.

MINICH, D. M. *et al.* Not All Maca Is Created Equal: A Review of Colors, Nutrition, Phytochemicals, and Clinical Uses. *Nutrients*, v. 16, n. 4, p. 530, 1 Feb. 2024a.

MINICH, D. M. *et al.* Not All Maca Is Created Equal: A Review of Colors, Nutrition, Phytochemicals, and Clinical Uses. *Nutrients*, v. 16, n. 4, p. 530, 1 Feb. 2024b.

PEDERSEN, S. B. *et al.* Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 288, n. 1, p. 191–197, 19 Oct. 2001.

PURNAMASARI, D. *et al.* Dysregulation of adipokines levels among healthy first-degree relatives of type 2 diabetes patients. *Heliyon*, v. 9, n. 8, p. e18887, 1 Aug. 2023.

QIU, C. *et al.* Analysis of Maceae and Macamide Contents of Petroleum Ether Extract of Black, Yellow, and Purple *Lepidium Meyenii* (Maca) and Their Antioxidant Effect on Diabetes Mellitus Rat Model. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 59, n. 0, 2016.

RENCZÉS, E. *et al.* The Role of Estrogen in Anxiety-Like Behavior and Memory of Middle-Aged Female Rats. *Frontiers in endocrinology*, v. 11, 7 Oct. 2020.

RIZZATTI, G. *et al.* Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. 2017.

RUBIO, J. *et al.* Effect of three different cultivars of *Lepidium meyenii* (Maca) on learning and depression in ovariectomized mice. *BMC Complementary and Alternative*

Medicine, v. 6, n. 1, p. 23, 23 Dec. 2006.

SANTOS, M. G. DOS *et al.* COMPOSTOS BIOATIVOS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA MACA (LEPIDIUM MEYENII WALPERS) PERUANA: UMA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA. *Ciência e Tecnologia de Alimentos: pesquisa e práticas contemporâneas - Volume 2*, p. 383–399, 2021.

SUTTON-TYRRELL, K. *et al.* Reproductive Hormones and Obesity: 9 Years of Observation From the Study of Women's Health Across the Nation. *American Journal of Epidemiology*, v. 171, n. 11, p. 1203–1213, 1 June. 2010.

TEIXEIRA, J. J. M. *et al.* Aplicações Terapêuticas da *Lepidium meyenii* (Maca) e seus compostos químicos: Uma Revisão Sistemática / Therapeutic Applications of *Lepidium meyenii* (Maca) and its chemical compounds: A Systematic Review. *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 10, p. 75883–75903, 7 out. 2020.

VALENTOVÁ, K. *et al.* Maca (*Lepidium meyenii*) and yacon (*Smallanthus sonchifolius*) in combination with silymarin as food supplements: in vivo safety assessment. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 46, n. 3, p. 1006–1013, Mar. 2008.

VEČEŘA, R. *et al.* The Influence of Maca (*Lepidium meyenii*) on Antioxidant Status, Lipid and Glucose Metabolism in Rat. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 62, n. 2, p. 59–63, 27 June. 2007.

WANG, S.; ZHU, F. Chemical composition and health effects of maca (*Lepidium meyenii*). *Food Chemistry*, v. 288, p. 422–443, 1 Aug. 2019.

WANG, Y. *et al.* Maca: An Andean crop with multi-pharmacological functions. *Food Research International*, v. 40, n. 7, p. 783–792, 1 Aug. 2007.

YÁBAR, E.; CHIRINOS, R.; CAMPOS, D. Phenolic compounds and antioxidant

capacity in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during preharvest, harvest and natural post-harvest drying. *Scientia Agropecuaria*, v. 10, n. 1, p. 85–97, 2019.

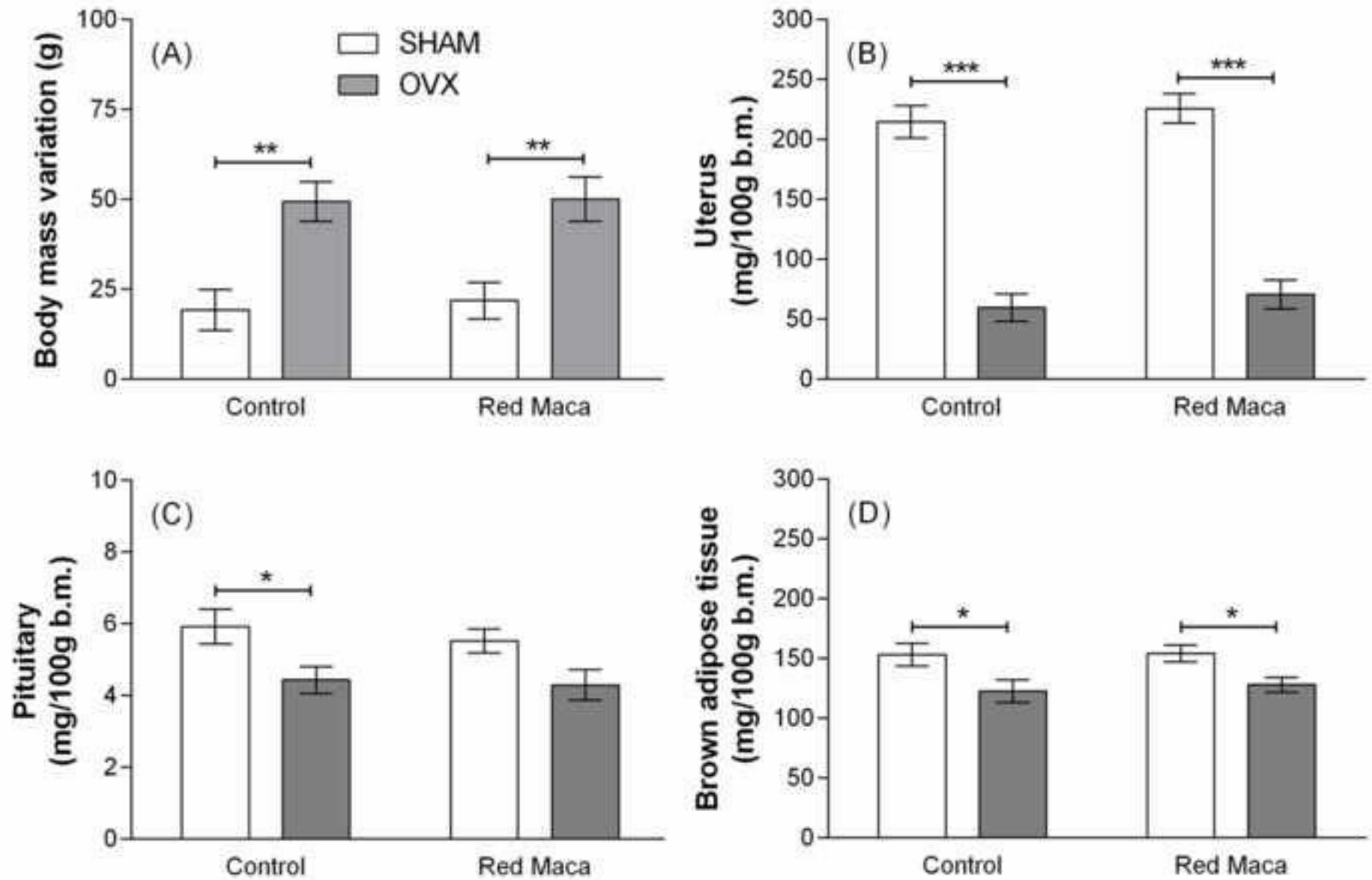
ZEVALLOS-CONCHA, A. *et al.* Effect of gamma irradiation on phenol content, antioxidant activity and biological activity of black maca and red maca extracts (*Lepidium meyenii* walp). *Toxicology mechanisms and methods*, v. 26, n. 1, p. 67–73, 2 Jan. 2016.

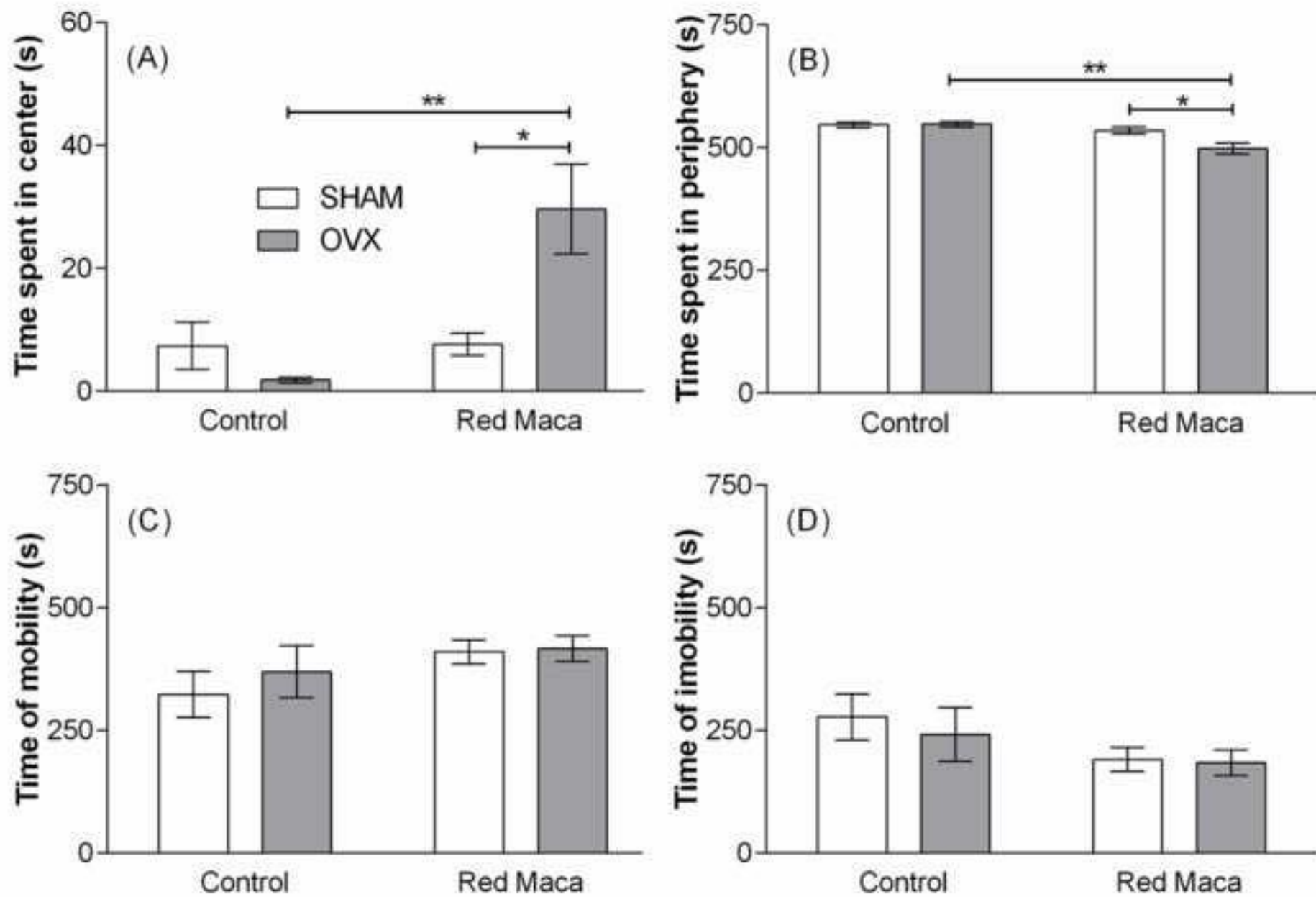
ZHANG, F. QIN; ZHANG, H. ZHU. The complete chloroplast genome sequence of the medicinal plant *Lepidium meyenii* Walp. (Cruciferae). *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, v. 5, n. 3, p. 2945–2947, 2 July. 2020.

ZHANG, Y. *et al.* Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, n. 1–2, p. 274–279, Apr. 2006.

ZHOU, S. *et al.* Menopause-induced uterine epithelium atrophy results from arachidonic acid/prostaglandin E2 axis inhibition-mediated autophagic cell death OPEN. Nature Publishing Group, 2016.

ZHU, H. *et al.* Deciphering the potential role of Maca compounds prescription influencing gut microbiota in the management of exercise-induced fatigue by integrative genomic analysis. *Frontiers in Nutrition*, v. 9, p. 1004174, 12 Oct. 2022.





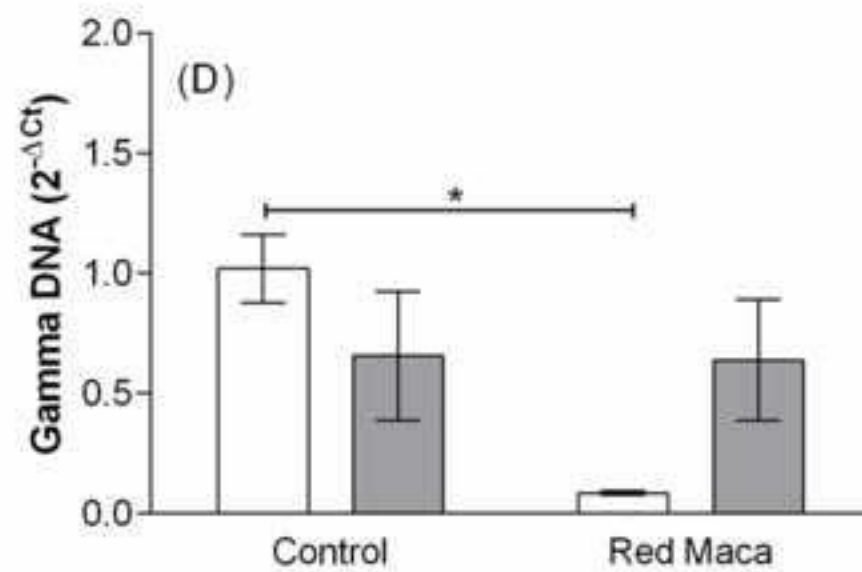
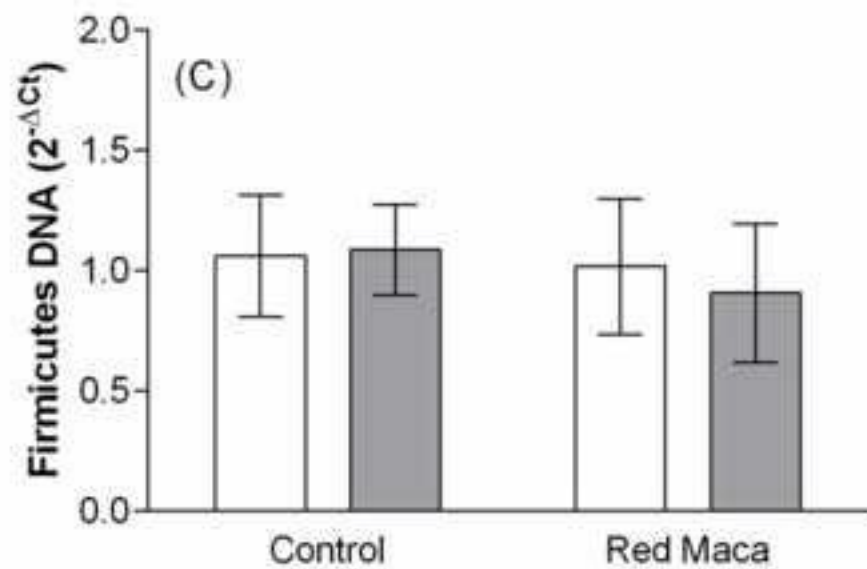
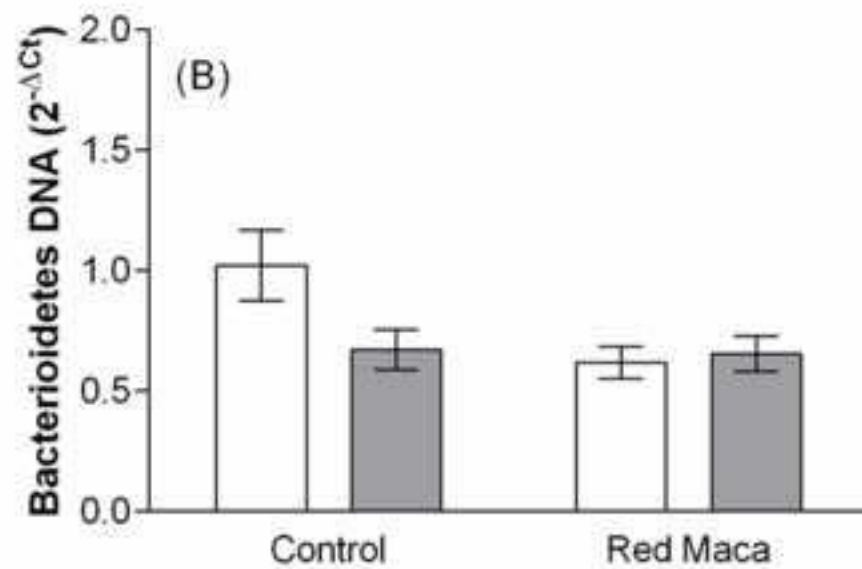
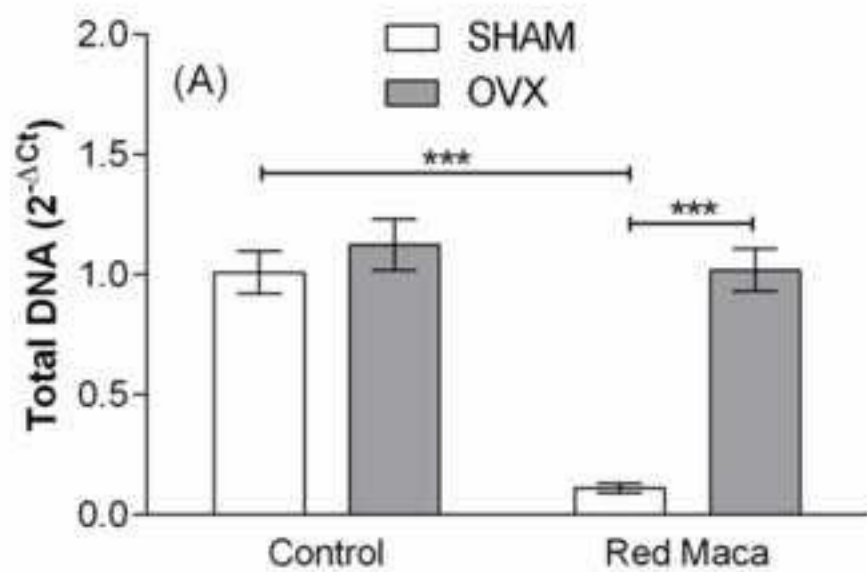


Table 1 – Effects of Red Maca treatment on casual glycemia, triglycerides, total cholesterol and total plasma calcium in SHAM (control) and ovariectomized (OVX) animals.

Variable	Group	Control		Red Maca		F values
		Mean	SE	Mean	SE	
Casual glycemia (mg/dL)	SHAM	124.26	13.25	111.27	8.75	Red Maca F (1, 30) = 1.33 OVX: F (1, 30) = 0.88
	OVX	113.50	12.48	102.30	7.17	
Triglycerides (mg/dL)	SHAM	130.09	9.20	142.72	9.78	Red Maca: F (1, 30) = 1.49 OVX: F (1, 30) = 2.03
	OVX	122.60	2.38	128.51	7.56	
Total cholesterol (mg/dL)	SHAM	120.33	6.62	138.40	9.08	Red Maca: F (1, 30) = 2.70 OVX: F (1, 30) = 1.12
	OVX	117.88	4.68	124.75	8.43	
Total calcium (mg/dL)	SHAM	11.72	0.71	11.46	0.72	Red Maca: F (1, 30) = 0.29 OVX: F (1, 30) = 0.00
	OVX	11.89	0.92	11.25	0.87	

Results were analyzed by Two-way ANOVA, followed by Sidak's posthoc test. SE: standard error.

Table 2 - Centesimal composition of Red Maca.

Component	Wet base	Dry base
Humidity (%)	7.04 ± 0.03	-
Ashes (%)	6.72 ± 0.05	7.23 ± 0.05
Lipids (%)	1.89 ± 0.08	2.03 ± 0.09
Proteins (%)	11.86 ± 0.68	12.76 ± 0.73
Total carbohydrates* (%)	72.49	77.98

*including fiber fraction and metabolizable carbohydrates. Results are expressed as mean, or as mean ± standard error.

Table 3 – Total phenolic content and flavonoids in Red Maca.

Total phenolic content (mg of GAE/g of sample)				
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Mean ± SE
Wet base	6.38 ± 0.03	5.97 ± 0.03	6.30 ± 0.03	6.22 ± 0.21
Dry base	6.86 ± 0.03	6.43 ± 0.03	6.78 ± 0.03	6.69 ± 0.23
Total flavonoids (mg of CE/g of sample)				
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Mean ± SE
Wet base	0.65 ± 0.05	0.63 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.64 ± 0.01
Dry base	0.70 ± 0.03	0.68 ± 0.05	0.67 ± 0.04	0.68 ± 0.01

CE: Catechine equivalent; GAE: Gallic acid equivalent; SE: standard error.

Table 4 - Antioxidant potential of Red Maca by DPPH and ABTS⁺ radical scavenging.

	(μmol TE/g of sample)			
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Mean ± SE
DPPH	130.84 ± 1.95	129.03 ± 7.34	132.05 ± 8.48	130.64 ± 1.52
ABTS ⁺	39.93 ± 1.37	38.78 ± 8.47	43.11 ± 1.55	40.61 ± 2.24

DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; ABTS⁺: 2,2'-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline6-Sulfonic Acid) Diammonium Salt; TE: TROLOX equivalent. SE: standard error.

Declaration of Interest Statement

Effects of Red Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) on behavioral, metabolic and biochemical parameters in ovariectomized rats

Martins AM, Chagas LA, Araújo LP, Almeida LA, Tavano OL, Ruginsk SG

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

A handwritten signature in black ink that reads "Silvia Graciela Ruginsk". The signature is written in a cursive style and is positioned above a horizontal line.

Silvia Graciela Ruginsk (MSc, PhD) –
Corresponding author

(on behalf of all authors)

ANEXO A – APROVAÇÃO CEUA UNIFAL/MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **INFLUÊNCIA DA *Lepidium meyenii* (MACA PERUANA), ASSOCIADA OU NÃO À ATIVIDADE FÍSICA, NO PERFIL LIPÍDICO, RESISTÊNCIA INSULÍNICA E ESTRESSE OXIDATIVO EM RATAS OVARIETOMIZADAS.**, registrada com o nº **0005/2022**, sob a responsabilidade de **Silvia Graciela Ruginsk Leitão**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **01/04/2022 a 30/03/2024**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Rato / Wistar	80	0	80	Biotério central da universidade federal de alfenas (unifal-mg)

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira Alfenas, 28 de Março de 2022
Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG