



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**JULIA APARECIDA GALDINO TORRALBA DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO CONSUMO DE CÚRCUMA E DE SIMBIÓTICO EM  
OSSOS DE RATOS SUBMETIDOS AO USO DE GLICOCORTICOIDE**

Presidente Prudente – SP  
2021



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**JULIA APARECIDA GALDINO TORRALBA DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO CONSUMO DE CÚRCUMA E DE SIMBIÓTICO EM  
OSSOS DE RATOS SUBMETIDOS AO USO DE GLICOCORTICOIDE**

Dissertação de Mestrado apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador:

Prof. Dr. Wilson Romero Nakagaki

Presidente Prudente - SP  
2021

636.213  
O48a

Oliveira, Julia Aparecida Galdino Torralba de  
Análise dos efeitos do consumo de cúrcuma e de  
simbiótico em ossos de ratos submetidos ao uso de  
glicocorticoide \ Julia Aparecida Galdino Torralba de  
Oliveira ; orientador Wilson Romero Nakagaki. --  
Presidente Prudente, 2021.  
59 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente  
Prudente, SP, 2021.  
Bibliografia.

1. Osso. 2. Osteoporose. 3. Glicocorticoide. 4.  
Simbiótico. 5. Curcumina. I. Nakagaki, Wilson Romero.  
II. Título.

**JULIA APARECIDA GALDINO TORRALBA DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO CONSUMO DE CÚRCUMA E DE SIMBIÓTICO EM  
OSSOS DE RATOS SUBMETIDOS AO USO DE GLICOCORTICOIDE**

Dissertação de Mestrado apresentada a  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-  
Graduação, Universidade do Oeste  
Paulista, como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Mestre em Ciências  
da Saúde.

Presidente Prudente, 22 de março de 2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Wilson Romero Nakagaki  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente – SP

---

Profa. Dra. Ana Clara Campagnolo Gonçalves Toledo  
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste  
Presidente Prudente – SP

---

Profa. Dra. Evelise Aline Soares  
Universidade Federal de Alfenas –  
Unifal – MG

## **DEDICATÓRIA**

Com gratidão e alegria, dedico este trabalho a Deus por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia e socorro presente em todos os momentos. Dedico a minha família pelo incentivo e compreensão durante as minhas ausências, ao meu marido e companheiro que nos dias difíceis permaneceu ao meu lado, com entendimento e paciência e abdicou de coisas para que eu pudesse concluir este projeto. Essa conquista é para vocês.

## **AGRADECIMENTOS**

Expresso minha gratidão a todos os profissionais do programa de mestrado em ciências da saúde por todas as dúvidas sanadas, pela estrutura e atenção que fornecem aos seus alunos ao longo da realização do trabalho. Agradeço ao meu orientador, o Professor Dr. Wilson Romero Nakagaki por ter aceitado acompanhar-me neste projeto, pela disponibilidade ao longo do percurso, por me direcionar com maestria e compartilhar seus conhecimentos para meu crescimento profissional e pessoal. Aos professores que tive oportunidade de conhecer e aprender e que me forneceram todas as bases necessárias para a realização deste trabalho. Aos funcionários do biotério experimental, especialmente a Graciele, que me auxiliou durante todo o processo de experimentação. As colegas de profissão Gleicy e Mariana, que por motivos de força maior não puderam acompanhar todo o processo do experimento, mas que mesmo assim contribuíram para realização deste trabalho. Agradeço também aos professores da graduação, que me inspiraram nesta escolha e também a querer crescer e ser melhor a cada dia e a Professora Dra. Sandra Cristina Genaro que me direcionou no início desta decisão. Gratidão a todos vocês.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)*

## LISTA DE SIGLAS

CT	– Grupo Controle
CEUA	– Comissão de Ética em Uso Animal
CSMI	– Momento de Inércia de Secção Transversal
COBEA	– Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
GC	– Glicocorticoide
OC	– Grupo Osteoporose Controle
OCCM	– Grupo Osteoporose e Cúrcuma
OS	– Grupo Osteoporose e Simbiótico
OSC	– Grupo Osteoporose e Simbiótico/Cúrcuma
UF	– Unidades Formadoras de Colônias
UNOESTE	– Universidade do Oeste Paulista



## LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Peso dos animais no início do experimento e no dia da eutanásia.....	21
---	----

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Análise dos níveis de fosfatase alcalina sérica.....	22
Figura 2 -	Análise dos níveis de cálcio sérico.....	22
Figura 3 -	Força máxima de resistência obtida pelo teste de flexão de três pontos.....	23
Figura 4 -	Deformação absoluta na força máxima dos fêmures durante o teste de flexão de três pontos.....	24
Figura 5 -	Rigidez Estrutural dos fêmures durante o teste de flexão de três pontos.....	24
Figura 6 -	Tensão dos fêmures durante o teste de flexão de três pontos.....	25
Figura 7 -	Deformação Relativa dos fêmures durante o teste de flexão de três pontos.....	26
Figura 8 -	Módulo Elástico dos fêmures durante o teste de flexão de três pontos.....	26
Figura 9 -	Razão 960/1660.....	27
Figura 10 -	Razão 1070/1660.....	28

## SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO – Análise dos efeitos do consumo de cúrcuma e de simbiótico em ossos de ratos submetidos ao uso de glicocorticoide.....	11
Introdução .....	14
Materiais e Métodos .....	16
Resultados .....	21
Discussão.....	28
Referências .....	34
APÊNDICES.....	38
APÊNDICE A - Imagem Teste Mecânico .....	39
APÊNDICE B - Preparação da Goma .....	40
ANEXOS .....	41
ANEXO A - Normas de Submissão da revista <i>Bone</i> .....	42
ANEXO B - Aprovação do Comitê de Ética .....	59

**ANÁLISE DOS EFEITOS DO CONSUMO DE CÚRCUMA E DE SIMBIÓTICO EM  
OSSOS DE RATOS SUBMETIDOS AO USO DE GLUCOCORTICOIDE**

**ANALYSIS OF THE EFFECTS OF CONSUMPTION OF TURMERIC AND  
SYMBOTIC IN BONE OF RATS SUBMITTED TO USE OF GLUCOCORTICOID**

Julia Aparecida Galdino Torralba de Oliveira<sup>1</sup>, Carlos José Leopoldo Constantino<sup>2</sup>,  
Wilson Romero Nakagaki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Mestrado em Ciências da Saúde-Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), Presidente Prudente, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Física, Química e Biologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Presidente Prudente, São Paulo, Brazil.

Autor para correspondência: Prof. Dr. Wilson Romero Nakagaki

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Rodovia Raposo Tavares, km 572 - Bairro do Limoeiro, Campus II

Presidente Prudente - SP, Brasil

CEP: 19067-175

E-mail: [wilromero@unoeste.br](mailto:wilromero@unoeste.br)

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: *Bone*, fator de impacto 4.146, qualis Capes A2 (medicina II)

## RESUMO

Os glicocorticoides possuem efeitos colaterais adversos podendo desencadear a osteoporose. Há evidências mostrando que simbióticos e curcumina podem prevenir a perda de massa óssea. O objetivo do trabalho foi analisar possíveis efeitos da curcumina e do simbiótico em ossos de ratos fêmeas submetidas à indução de osteoporose por dexametasona durante 5 semanas. Foram utilizadas 50 ratas *Wistar* distribuídas em cinco grupos: grupo controle (CT), grupo osteoporose controle (OC), grupo osteoporose e simbiótico (OS), grupo osteoporose e curcumina (OCCM) e grupo osteoporose e simbiótico/curcumina (OSC). A dexametasona foi aplicada três vezes na semana, enquanto o simbiótico e a curcumina foram administrados diariamente. Após a eutanásia dos animais, foram realizadas dosagens de fosfatase alcalina e cálcio, análise das propriedades estruturais e materiais e análise de Raman dos fêmures. A fosfatase alcalina foi maior no grupo OCCM. A força máxima e a rigidez estrutural foram maiores no grupo CT. A tensão foi menor e semelhante entre os grupos osteoporose. O grupo CT apresentou menor porcentagem de deformação relativa, o grupo OC apresentou maior deformação em comparação os grupos OCCM e o grupo OS se deformou mais do o grupo OCMM. O grupo CT apresentou maior módulo elástico em relação aos grupos OC, OS e OSC. A razão 960/1660 dos grupos OC, OS e OSC foram diferentes do grupo CT. A razão 1070/1660 foi maior no grupo OCCM. Então, foi possível verificar que a curcumina possui efeitos promissores relacionados ao aumento da resistência óssea e da mineralização mediante a indução de osteoporose por glicocorticoide.

**Palavras-chave:** Osso; Osteoporose; Glicocorticoide; Simbiótico; Curcumina.

## ABSTRACT

Glucocorticoids have adverse side effects that can trigger osteoporosis. There is evidence showing that symbiotics and curcumin can prevent bone loss. The objective of the work was to analyze possible effects of curcumin and symbiotic on the bones of female rats submitted to osteoporosis induction by dexamethasone for 5 weeks. 50 Wistar rats were used, distributed in five groups: control group (CT), control osteoporosis group (OC), osteoporosis and symbiotic group (OS), osteoporosis and curcumin group (OCCM) and osteoporosis and symbiotic / curcumin group (OSC). Dexamethasone was applied three times a week, while symbiotic and curcumin were administered daily. After euthanizing the animals, measurements of alkaline phosphatase and calcium were performed, analysis of structural and material properties and Raman analysis of the femurs. Alkaline phosphatase was higher in the OCCM group. The maximum strength and structural stiffness were higher in the CT group. The tension was lower and similar between the osteoporosis groups. The CT group had a lower percentage of relative deformation, the OC group had a greater deformation compared to the OCCM groups and the OS group was more deformed than the OCCM group. The CT group presented a greater elastic modulus in relation to the OC, OS and OSC groups. The 960/1660 ratio of the OC, OS and OSC groups were different from the CT group. The 1070/1660 ratio was higher in the OCCM group. So, it was possible to verify that curcumin has promising effects related to the increase in bone strength and mineralization through the induction of osteoporosis by glucocorticoid.

**Keywords:** Bone; Osteoporosis; Glucocorticoid; Symbiotic; Curcumin.

## 1. Introdução

Os glicocorticoides (GC) pertencem a uma classe de medicamentos que são utilizados no tratamento de muitas doenças, uma vez que apresentam efeitos antiinflamatório, anti-imune e anti-infeccioso. Como a maioria dos medicamentos, os GC possuem efeitos colaterais adversos e seu uso a médio e longo prazo pode promover o desenvolvimento da osteoporose, provocando a diminuição da massa óssea, diminuindo sua resistência mecânica e, portanto, permitindo a ocorrência de fraturas [1]. Isso ocorre porque os GC são responsáveis pela diminuição da absorção intestinal e da reabsorção tubular renal de cálcio, além de exercerem um efeito tóxico direto nos genes reguladores das células ósseas, osteoblastos, por exemplo [2].

Além dos fatores previamente mencionados, ainda há evidências na literatura de que algumas doenças intestinais como a colite ulcerativa e a doença de Crohn, podem comprometer a qualidade óssea [3,4]. Estas doenças inflamatórias do intestino são caracterizadas pelo desequilíbrio da microbiota intestinal, levando a uma resposta inflamatória descontrolada que afeta outros órgãos além do trato gastrointestinal, como por exemplo, os ossos [5]. Deste modo, há uma associação entre a saúde do intestino e a saúde óssea.

A saúde da microbiota intestinal é muito importante, considerando que nela habitam micro-organismos comensais, simbióticos e patogênicos. Esta microbiota exerce papel importante sobre a saúde óssea, auxiliando a produção de serotonina intestinal e aumentando a absorção de cálcio e, portanto, participando na preservação da saúde óssea. Entretanto, a microbiota pode ser alterada, positiva ou negativamente, por diversos fatores como os hábitos alimentares inadequados, o uso prolongado de medicamentos e o uso de prebióticos, probióticos e simbióticos [6].

No estudo de Ohlsson et al. [7] foi observado diminuição da perda óssea de camundongos fêmeas ovariectomizadas que foram tratadas com o uso de probióticos. Scholz-Ahrens et al. [8] avaliaram o efeito de simbiótico contendo *Lactobacillus*, *Bacteroides*, e *Bifidobacterium* no metabolismo ósseo de ratas ovariectomizadas e observaram que houve uma prevenção na perda do conteúdo mineral ósseo. Porém, em todas essas situações a osteoporose foi

induzida cirurgicamente, não acarretando danos na microbiota intestinal, diferentemente do que ocorre quando há o uso de glicocorticoides.

Neste contexto, o uso de alimentos, suplementos e medicamentos para o tratamento de doenças relacionadas ao osso, como a osteoporose, tem se mostrado eficiente, reduzindo o risco de fraturas. Essa eficiência de tratamento depende de outras variáveis como sexo e idade, que podem influenciar e limitar a eficácia deste uso [9,10]. A utilização de alimentos para tratamento e prevenção de doenças tem ocorrido por muitos anos. Porém, a alimentação funcional tem despertado atenção de muitos pesquisadores e vem sendo muito utilizada [11]. A *Curcuma longa L.*, considerada como um alimento funcional é popularmente conhecida como cúrcuma, açafrão da Índia ou gengibre dourado. Esta planta é cultivada em países asiáticos, possui pequeno porte e é utilizada há anos como especiaria por causa da sua pigmentação amarela e sabor forte [12].

O consumo da curcumina tem sido realizado para combater diversas doenças. Ela é um composto fenólico que possui ações terapêuticas significativas, demonstrando potentes efeitos antiinflamatório, anticancerígeno e antimicrobiano [13]. Chen et al. [1] demonstraram em seu estudo que a curcumina reduz a perda óssea provocada pela ovariectomia e também diminui a osteoclastogênese em ratos. Yang et al. [14] verificaram que a curcumina melhorou a microarquitetura óssea e aumentou a densidade mineral óssea em camundongos transgênicos APP/PS1 após demência senil, a qual promove enfraquecimento do osso. Além disso, Chen et al. [15] demonstrou que a curcumina atenuou a osteoporose induzida por GC ao inibir a apoptose osteocítica.

Considerando os dados apresentados, este trabalho analisou os efeitos do consumo de curcumina e da suplementação por simbiótico para prevenir e/ou minimizar os danos nos ossos de ratos submetidos à indução de osteoporose por uso de GC.



## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Animais

Neste estudo foram utilizadas ratas da linhagem *Wistar* (n = 50), com 60 dias de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE). O projeto foi submetido à Comissão de Ética em Uso Animal (CEUA) da referida universidade e seguiu as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), sendo aprovado sob protocolo número 5893. Em cada gaiola foram mantidos dois animais, separados aleatoriamente, com livre acesso à água e à alimentação (ração comercial), onde permaneceram em ambiente com temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) controlada, em ciclo claro/escuro de 12 horas, durante todo o experimento.

### 2.2. Divisão dos grupos

Os animais foram distribuídos aleatoriamente, em cinco grupos experimentais (10 por grupo) do seguinte modo:

- Grupo controle (CT): os animais receberam somente água e ração comercial;
- Grupo osteoporose controle (OC): os animais receberam água, ração comercial e foram submetidos ao uso de dexametasona durante 5 semanas (3 vezes por semana);
- Grupo osteoporose e simbiótico (OS): os animais receberam água e ração comercial e foram submetidos ao uso de dexametasona durante 5 semanas (3 vezes por semana) e ao consumo concomitante de simbiótico durante 5 semanas (diariamente);
- Grupo osteoporose e cúrcuma (OCCM): os animais receberam água e ração comercial e foram submetidos ao uso de dexametasona durante 5 semanas (3 vezes por semana) e ao consumo concomitante de curcumina durante 5 semanas (diariamente);
- Grupo osteoporose e simbiótico/cúrcuma (OSC): os animais receberam água e ração comercial e foram submetidos ao uso de dexametasona durante 5 semanas (3 vezes por semana) e ao consumo concomitante de simbiótico e curcumina durante 5 semanas (diariamente).

Os animais foram pesados no início do tratamento, ao final de cada semana e no dia da eutanásia com o intuito de verificar possíveis alterações no peso corporal mediante o uso da dexametasona, da curcumina e do simbiótico.

### 2.3. Protocolo de indução da osteoporose

A indução da osteoporose foi feita de acordo com o protocolo (modificado) estabelecido por Lucinda et al. [16]. Por via intramuscular, foi administrada dexametasona (fosfato dissódico de dexametasona – 4mg/ml, ampola 2,5 ml) na dose de 7mg/Kg de peso corporal, três vezes por semana, durante cinco semanas. A dexametasona foi injetada nos membros posteriores, alternando a aplicação entre os lados direito e esquerdo.

### 2.4. Suplementação com simbiótico

O simbiótico utilizado tinha em sua composição *Lactobacillus acidophilus* SD 5221 NCFM, *Lactobacillus rhamnosus* SD 5675 HN001, *Lactobacillus para casei* SD 5275 LPC-37, *Bifidobacterium lactis* SD5674 HN0019 e fruto-oligossacarídeo (5,5g). Para tanto, foi utilizado o protocolo descrito por Tagliari et al. [17]. O simbiótico foi administrado por via oral (concomitante ao uso de dexametasona) na dose diária de 200 mg/kg/dia/animal todos os dias através da ingestão de goma [18]. Segundo os autores, esta corresponde à “dose aproximada de 200.000 a 206.109 UFC (unidades formadoras de colônias)” e é uma estimativa da dose diária necessária para o ser humano.

### 2.5. Suplementação com curcumina

A administração da Curcumina foi realizada através da ingestão de gomas [18], diariamente, durante 5 semanas, na dose de 100 mg/kg, dissolvida em solução salina a 0,9%, segundo Cirano et al. [19]. Esse consumo ocorreu concomitantemente ao uso de dexametasona.

### 2.6. Preparo da Goma

As gomas utilizadas para o tratamento foram confeccionadas de acordo com o estudo de Souza et al. [18]. A administração da goma com curcumina e/ou simbiótico foi realizada via oral, de forma individual, assegurando que foi

ofertada para cada animal a quantidade de simbiótico Tagliari et al. [17] e curcumina Cirano et al. [19] estabelecida por seus protocolos. Tal fato foi verificado considerando a boa aceitação das gomas pelos animais que as consumiram por completo.

### *2.6. Eutanásia dos animais e coleta do material biológico*

Ao fim do período experimental (5 semanas) e após um jejum de 4 horas, os animais foram anestesiados através da administração de solução de cloridrato de cetamina (75 mg/Kg de peso na concentração de 100 mg/mL) e de cloridrato de xilazina (10 mg/Kg de peso na concentração de 20 mg/mL) via intraperitoneal. Posteriormente à anestesia geral, foram realizadas toracotomia e punção cardíaca para coleta de sangue em tubos a vácuo. Foram verificados os indicativos de morte, tais como ausência de movimentos respiratórios, batimentos cardíacos e perda dos reflexos. Em caso de não constatação da morte do animal, foi administrado tiopental (60mg/Kg) via intra-peritoneal para tal fim [20].

### *2.8. Análises Bioquímicas*

Os tubos com sangue foram centrifugados a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C. Plasma e soro foram aliquotados e armazenados em geladeira (para análises imediatas) ou em freezer a - 20°C até o momento das análises bioquímicas para dosagens séricas de cálcio total e de fosfatase alcalina.

### *2.9. Ensaio mecânico*

Para cada grupo foram utilizadas 10 amostras. O fêmur direito de cada animal foi testado mecanicamente, até sua fratura completa, em teste de flexão em 3 pontos a uma velocidade de 0,05 mm/s (3 mm/min) no equipamento mecânico INSTRON (modelo EMIC 23-2S), com célula de carga de 100 Kgf. A distância entre os 2 suportes inferiores foi de 17mm. Cada fêmur foi testado no plano anteroposterior (concavidade voltada para cima), com o lado anterior voltado para cima suportando compressão e com o lado posterior para baixo suportando tensão.

Os dados de força (ou carga) e de deformação absoluta (ou deslocamento) foram obtidos diretamente da máquina de ensaio que foram registrados pelo *software* do computador acoplado à máquina de ensaio. Os registros destes dados foram utilizados para aquisição das propriedades estruturais força máxima, deformação absoluta na força máxima e rigidez estrutural (ou extrínseca). A rigidez extrínseca foi calculada como sendo a inclinação da porção mais linear da região elástica da curva força-deformação absoluta [21, 22].

As propriedades materiais foram calculadas a partir das propriedades estruturais [21, 23]. As propriedades materiais avaliadas foram a tensão máxima, deformação relativa na tensão máxima e módulo elástico (ou rigidez intrínseca). Os ossos foram fotografados em secção transversal para calcular o momento transversal de inércia (CSMI) e a seguinte fórmula [23] foi utilizada para este fim:

$$\sum_{i=1}^n \left( \frac{wh^3}{12} + whd_i^2 \right)$$

Na fórmula anterior, I é o CSMI, n o número de pixels, w e h altura e a largura de cada pixel, e  $d_i$  é a distância do centro do elemento da área a um determinado eixo na secção transversal.

As propriedades materiais foram obtidas pelas três fórmulas a seguir, nas quais o símbolo  $\sigma$  é a tensão, L representa a distância entre os dois suportes inferiores, c é a distância máxima dos pixels à linha que cruza o centro da massa,  $\varepsilon$  é a deformação relativa, d é a deformação absoluta e E é o módulo elástico.

$$\sigma = \frac{\text{força} \cdot L \cdot c}{4l}$$

$$\varepsilon = \frac{12 \cdot c \cdot d}{L^2}$$

$$E = \frac{\text{rigidez estrutural} \cdot L^3}{48l}$$

### 2.10. Espectroscopia de espalhamento Raman

As medidas de espectroscopia Raman foram obtidas com um espectrógrafo micro-Raman, modelo inVia da marca Renishaw, sendo o Raman equipado com microscópio óptico da marca Leyca. O comprimento de onda do laser utilizado foi de 785 nm [24] e com rede de difração de 1200 linhas por mm. O tempo de exposição adotado foi de 10 segundos, com 5 acumulações e intervalo espectral foi de 200  $\text{cm}^{-1}$  a 1800  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram coletados utilizando uma lente objetiva de 50X. A análise foi obtida a partir do osso cortical do ponto médio da diáfise dos fêmures não descalcificados.

Nesta análise, foram usados picos de intensidade relativos de alguns pares de banda (960, 1070, 1660) do espectro de Raman. Assim, as seguintes razões foram usadas:  $\nu^1\text{PO}_4^{3-}$ /amide I (960/1660) [25] e  $\nu^1\text{CO}_3^{2-}$ /amide I (1070/1660) [26]. A razão 960/1660 indica a quantidade de mineralização e a razão 1070/1660 pode indicar o *turnover* e a atividade de remodelamento ósseo [25, 26]

### 2.11. Análise estatística

A análise estatística dos dados apresentou normalidade e homocedasticidade e, por isso, para analisar os 4 grupos osteoporose foi empregada Análise de Variância de 1 via (ANOVA - *One Way*), seguido de teste *a posteriori* de Tukey. Para comparar o grupo controle com grupos osteoporose, foi usado o teste t de *Student*. O peso inicial e o peso final de cada animal foram analisados pelo teste t pareado. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Todos os testes foram feitos com 5% de nível de significância.

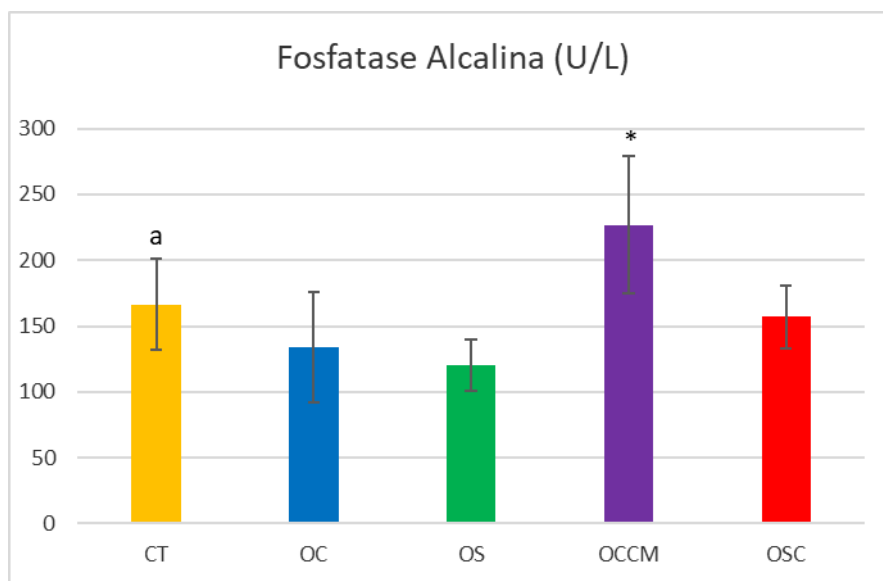
### 3. Resultados

**Tabela 1.** Peso dos animais no início do experimento e no dia da eutanásia.

<b>Grupos</b>	<b>Peso inicial</b>	<b>Peso final</b>	<b>Valor de <math>p</math></b>
Controle (CT)	234,23 ± 9,8	236,2 ± 8,5*	0,0490
Osteoporosecontrole (OC)	243,05 ± 17,5	236,24 ± 12,3	0,3122
Osteoporosesimbótico (OS)	239,53 ± 10,0	244,55 ± 16,7	0,5482
Osteoporose curcumina (OCCM)	233,56 ± 20,8	218,52 ± 21,2*	0,0133
Osteoporosesimbótico/curcumina (OSC)	238,08 ± 15,3	224,98 ± 16,5	0,0962

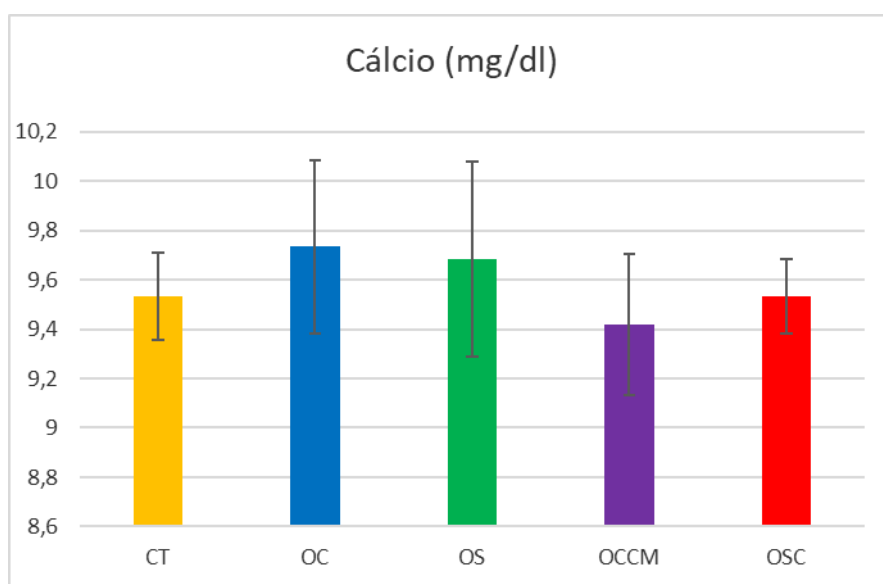
O peso dos animais no início do experimento não demonstrou diferença estatística entre os grupos osteoporose ( $p = 0,7325$ ) e entre estes e o grupo CT (CT vs. OC,  $p = 0,4454$ ; CT vs. OS,  $p = 0,4531$ ; CT vs. OCCM,  $p = 0,9594$ ; CT vs. OSC,  $p = 0,7004$ ). Quando analisado o peso final dos animais dos grupos osteoporose, a única diferença encontrada foi entre o grupo OS e OCCM ( $p < 0,05$ ), sendo OS maior que o OCCM (tabela 1). No entanto, a maioria desses grupos OC, OCCM e OSC foram diferentes estatisticamente do grupo CT (CT vs. OC,  $p = 0,0095$ ), (CT vs. OCCM,  $p = 0,0073$ ), (CT vs. OSC,  $p = 0,0047$ ), com exceção do grupo OS (CT vs. OS,  $p = 0,1058$ ). Ao se analisar o peso inicial com o peso final de cada grupo separadamente, foi constatado que o grupo CT apresentou aumento, o grupo OCCM mostrou diminuição e os demais grupos mantiveram o valor de seus pesos corporais (tabela 1).

As dosagens bioquímicas quantificaram o conteúdo de fosfatase alcalina e de cálcio séricos. A fosfatase alcalina apresentou maior conteúdo no grupo OCCM em relação aos grupos OC ( $p < 0,01$ ), OS ( $p < 0,01$ ) e OSC ( $p < 0,05$ ). A quantidade dessa enzima no grupo CT foi menor em relação ao grupo OCCM ( $p = 0,0391$ ), porém maior em relação ao grupo OS ( $p = 0,0175$ ) e sem diferença estatística quando comparada aos grupos OC ( $p = 0,1741$ ) e OSC ( $p = 0,5976$ ) (Figura 1).



**Figura 1.** Análise dos níveis de fosfatase alcalina sérica. O asterisco indica diferença estatística do grupo osteoporose curcumina (OCCM) em relação aos demais grupos osteoporose. A letra “a” demonstra diferença estatística do grupo controle (CT) em relação aos grupos osteoporose.

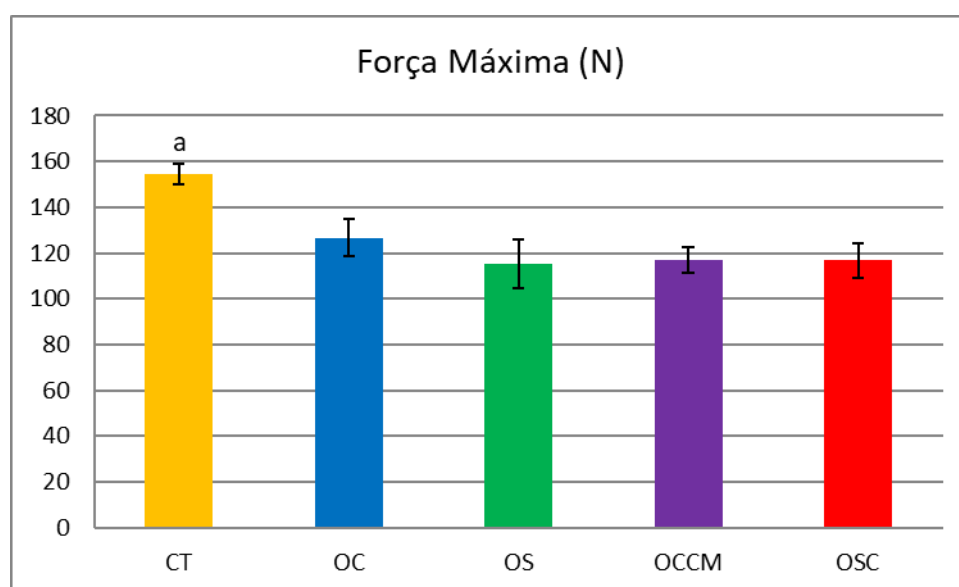
O conteúdo de cálcio não mostrou diferença estatística entre os grupos osteoporose ( $p = 0,3017$ ) e entre estes e o grupo CT (CT vs. OC,  $p = 0,2393$ ; CT vs. OS,  $p = 0,4170$ ; CT vs. OCCM,  $p = 0,4138$ ; CT vs. OSC,  $p = 1,0$ ) (Figura 2).



**Figura 2.** Análise dos níveis de cálcio sérico. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos osteoporose e também entre eles e o grupo controle.

O ensaio mecânico do presente estudo teve como propósito analisar tanto as propriedades estruturais quanto as propriedades materiais. Dentre as primeiras, foram obtidas a força máxima resistida pelo osso, a deformação absoluta (também conhecida por deslocamento) e a rigidez estrutural (ou extrínseca).

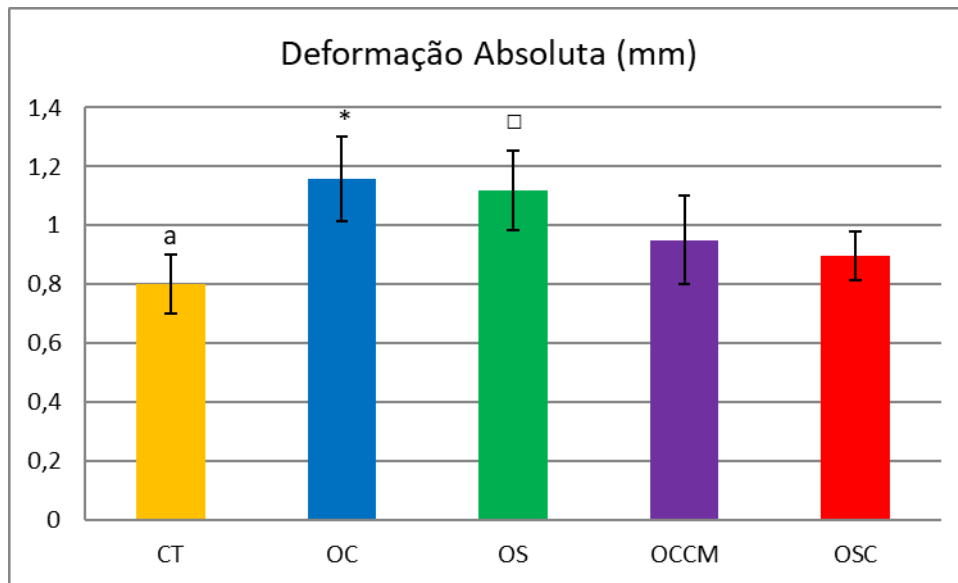
A força máxima foi similar entre os quatro grupos submetidos ao uso de dexametasona (OC, OS, OCCM e OSC) para indução de osteoporose ( $p = 0,0507$ ). Entretanto, o grupo controle (CT) resistiu à maior força quando comparado aos 4 grupos osteoporose (CT vs. OC,  $p < 0,0001$ ; CT vs. OS,  $p < 0,0001$ ; CT vs. OCCM,  $p < 0,0001$ ; CT vs. OSC,  $p < 0,0001$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Força máxima de resistência obtida pelo teste de flexão de três pontos. A letra “a” demonstra que houve diferença estatística entre o grupo controle, comparado aos grupos osteoporose.

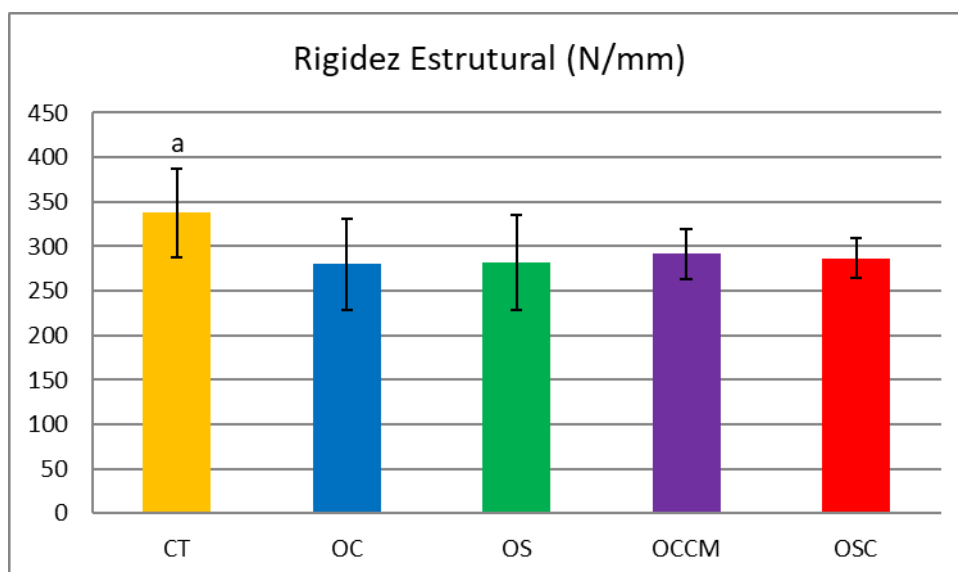
A deformação absoluta máxima foi maior no grupo OC em relação aos grupos OCCM ( $p < 0,05$ ) e OSC ( $p < 0,01$ ) e também foi maior no grupo OS quando comparado ao grupo OSC ( $p < 0,01$ ). O grupo CT deformou menos do que os demais com exceção do grupo OSC (CT vs. OC,  $p < 0,0001$ ; CT vs. OS,  $p = 0,0001$ ; CT vs. OCCM,  $p = 0,0359$ ; CT vs. OSC,  $p = 0,0576$ ) (Figura 4).





**Figura 4.** Deformação absoluta na força máxima dos fêmures durante o teste de flexão de três pontos. O asterisco indica diferença estatística entre os grupos OC em relação aos grupos OCCM e OSC. O quadrado indica que houve diferença entre o grupo OS quando comparado ao grupo OSC. E a letra “a” demonstra diferença estatística entre o grupo CT e os demais grupos osteoporose, exceto o grupo OSC.

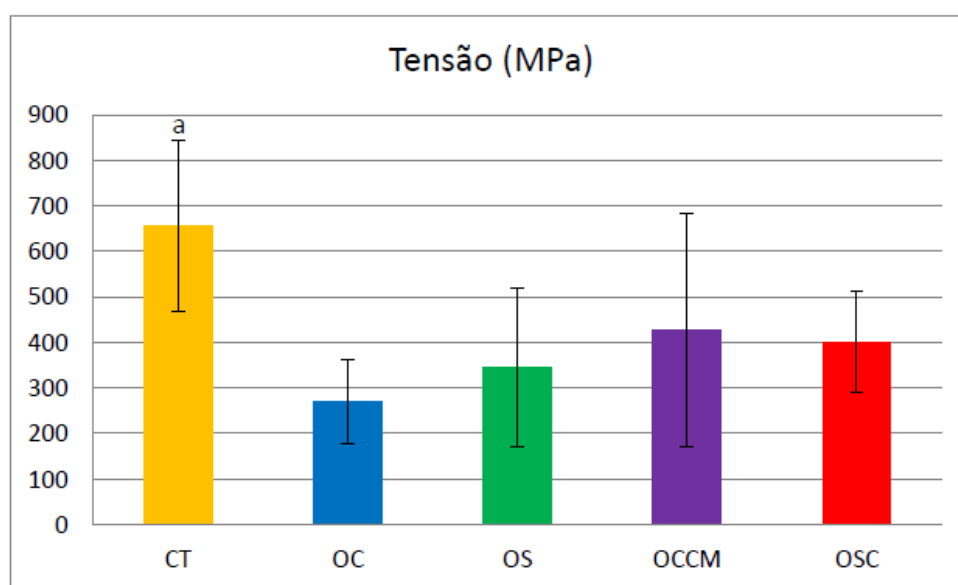
A rigidez estrutural não demonstrou diferença estatística entre os grupos osteoporose ( $p = 0,9402$ ), mas foi maior no grupo CT em relação aos demais (CT vs. OC,  $p = 0,0441$ ; CT vs. OS,  $p = 0,0475$ ; CT vs. OCCM,  $p = 0,0380$ ; CT vs. OSC,  $p = 0,0196$ ) (Figura 5).



**Figura 5.** Rigidez Estrutural dos fêmures durante o teste de flexão de três pontos. A letra “a” demonstra diferença estatística em relação ao grupo CT, comparado aos grupos osteoporose.

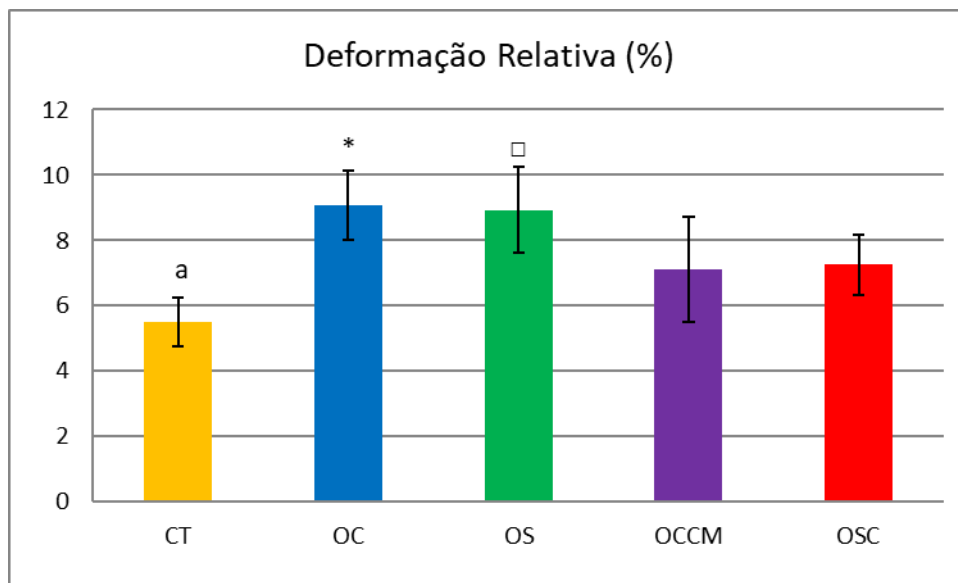
As propriedades materiais analisadas neste trabalho foram a tensão máxima, a deformação relativa na tensão máxima e o módulo elástico.

A tensão foi semelhante entre os grupos osteoporose ( $p = 0,3521$ ), os quais foram apresentaram tensões menores do que o grupo CT (CT vs. OC,  $p = 0,0003$ ; CT vs. OS,  $p = 0,0040$ ; CT vs. OCCM,  $p = 0,0618$ ; CT vs. OSC,  $p = 0,0051$ ) (Figura 6).



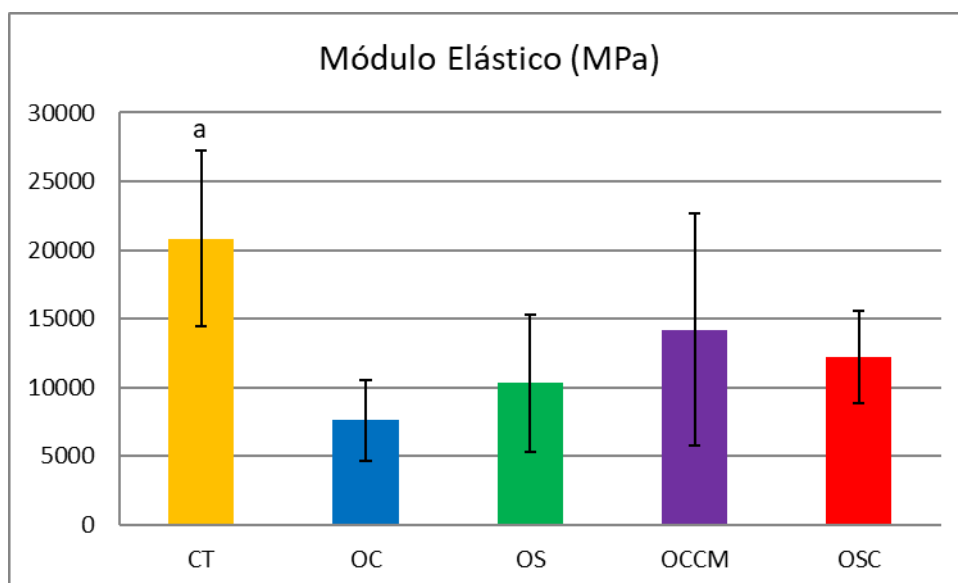
**Figura 6.** Tensão dos fêmures durante o teste de flexão de três pontos. A tensão foi semelhante entre os grupos osteoporose, e menores do que o grupo controle, representado pela letra “a”.

Além disso, os fêmures do grupo CT apresentaram menor porcentagem de deformação em relação aos outros 4 grupos (CT vs. OC,  $p < 0,0001$ ; CT vs. OS,  $p < 0,0001$ ; CT vs. OCCM,  $p = 0,0248$ ; CT vs. OSC,  $p = 0,0010$ ). O grupo OC apresentou maior deformação em comparação os grupos OCCM ( $p < 0,05$ ) e OSC ( $p < 0,05$ ), enquanto o grupo OS se deformou mais do o grupo OCMM ( $p < 0,05$ ) (Figura 7).



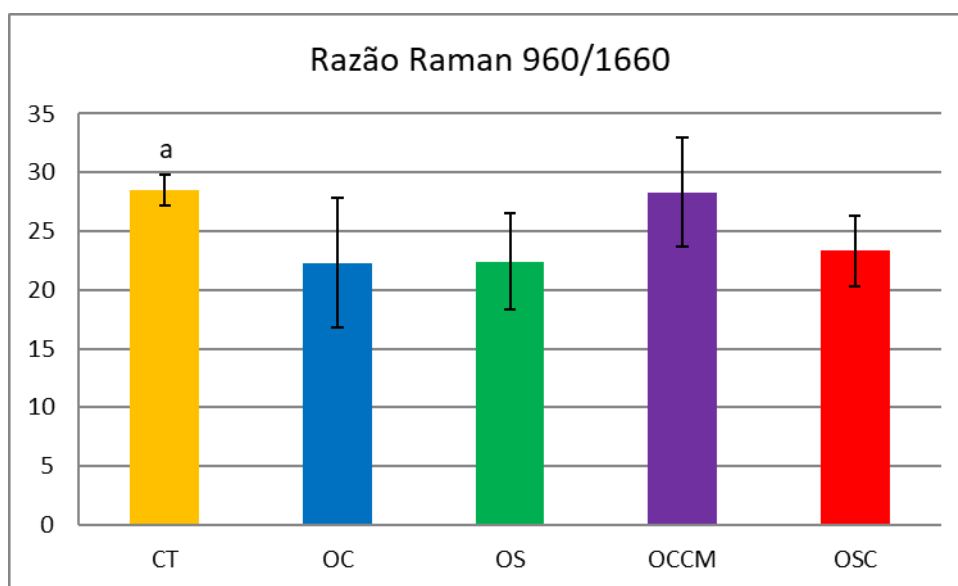
**Figura 7.** Deformação Relativa dos fêmures durante o teste de flexão de três pontos. O grupo CT apresentou menor porcentagem de deformação em relação aos outros quatro grupos osteoporose, representado pela letra “a”. O asterisco representa diferença estatística entre OC e os grupos OCCM e OSC. O quadrado representa que houve diferença estatística entre o grupo OS e o grupo OCMM.

O módulo elástico foi similar entre os grupos osteoporose ( $p = 0,1378$ ), porém grupo CT apresentou maior módulo em relação aos grupos OC ( $p = 0,0002$ ), OS ( $p = 0,0025$ ) e OSC ( $p = 0,0045$ ) (Figura 8).



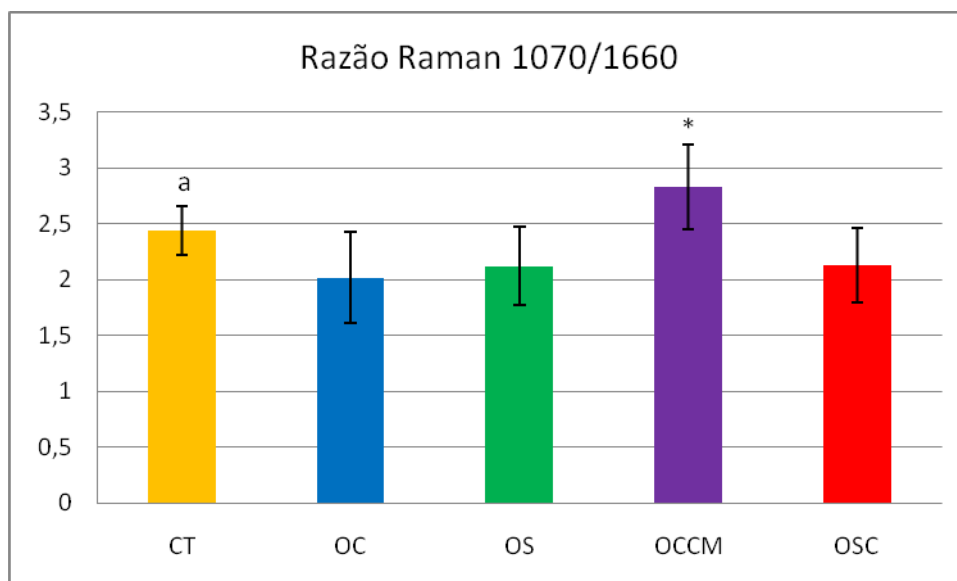
**Figura 8.** Módulo Elástico dos fêmures durante o teste de flexão de três pontos. A letra “a” demonstra diferença estatística do grupo CT em relação aos grupos OC, OS e OSC.

A análise de Raman mostrou que para a razão 960/1660 não ocorreu diferença entre os quatro grupos osteoporose ( $p = 0,0699$ ), mas que os grupos OC, OS e OSC foram diferentes estatisticamente do grupo CT (CT vs. OC,  $p = 0,0129$ ; CT vs. OS,  $p = 0,0129$ ; CT vs. OSC,  $p = 0,0064$ ), enquanto o grupo OCCM foi similar (CT vs. OCCM,  $p = 0,9230$ ) (Figura 9).



**Figura 9.** Razão 960/1660. A letra a demonstra diferença estatística entre os grupos OC, OS e OSC comparados ao grupo CT.

Para a razão 1070/1660 foi observada diferença entre o grupo OCCM e os demais grupos osteoporose (OCCM vs. OC,  $p < 0,01$ ; OCCM vs. OS,  $p < 0,05$ ; OCCM vs. OSC,  $p < 0,05$ ). Quando comparado ao grupo CT, somente foi constatada diferença em relação ao grupo OC ( $p = 0,0484$ ) (Figura 10).



**Figura 10.** Razão 1070/1660. O asterisco demonstra que houve diferença estatística entre o grupo OCCM e os demais grupos osteoporose OC, OS e OSC. A letra a indica diferença entre o grupo CT e o grupo OC.

#### 4. Discussão

O objetivo do presente trabalho foi analisar se uso dos suplementos alimentares curcumina e simbióticos seriam capazes de prevenir ou atenuar a perda de massa óssea decorrente do uso de dexametasona. Além disso, também foi proposto verificar como estes suplementos poderiam influenciar a resistência mecânica e a mineralização dos fêmures bem como os níveis séricos de cálcio e de fosfatase alcalina de ratas *Wistar*.

O uso de dexametasona provocou perda de peso do grupo OCCM, porém os outros grupos osteoporose mantiveram seus pesos em relação ao início do experimento. Segundo Pereira et al. [27], o uso prolongado de GC e uma diminuição repentina da dose ou suspensão abrupta do uso deste medicamento, podem favorecer o aparecimento de alguns efeitos colaterais, tais como desidratação, distúrbios gastrointestinais, letargia, hiponatremia, hipercalemia, hipotensão e também perda de peso. Neste contexto, o uso do simbiótico pode ter contribuído para a manutenção do peso dos animais, estimulando a atividade e crescimento das bactérias favoráveis à microbiota intestinal [6] e possivelmente prevenindo a ocorrências de disfunções neste órgão.

O uso prolongado de dexametasona provoca outros efeitos colaterais como a diminuição da massa óssea e a diminuição da resistência mecânica, facilitando a ocorrência de fraturas [1]. Seu uso prolongado é responsável pela diminuição da absorção intestinal e da reabsorção tubular renal de cálcio, além de poder exercer um efeito tóxico direto nos genes reguladores das células ósseas como, por exemplo, os osteoblastos [2]. Em contrapartida, evidências em alguns estudos demonstraram que o simbiótico [7,8] e a curcumina [1,14] promoveram alguns benefícios sobre o tecido ósseo.

As células ósseas atuam em conjunto na homeostasia do tecido [28] e o uso prolongado de glicocorticoides prejudica esse equilíbrio, comprometendo o conteúdo mineral e de macromoléculas, como o colágeno tipo I, presentes na matriz óssea [29,30] e, deste modo, interfere na constituição das partes orgânicas e inorgânicas do tecido ósseo. Ambas as partes estão relacionadas desde que a massa mineral confere a dureza e o colágeno propicia flexibilidade e elasticidade para esses órgãos [23]. Dessa forma, o resultado encontrado após ensaio mecânico deste trabalho mostrou que o protocolo de indução de osteoporose utilizado teve seu propósito alcançado, considerando que as forças máximas de resistência à fratura dos grupos que receberam dexametasona (OC, OS, OCCM e OSC) foram menores e diferentes quando comparadas ao grupo controle (CT), que resistiu a uma força maior.

Em relação à deformação absoluta, que reflete o envergamento do osso como um todo durante a aplicação de força, foi verificado maior valor desta propriedade no grupo OC em relação aos grupos OCCM e OSC e também maior deformação no grupo OS quando comparado ao grupo OSC. O grupo CT deformou menos do que os demais grupos, com exceção do OSC. Estes dados mostraram que os fêmures dos animais submetidos ao uso de dexametasona apresentaram maior variação na sua forma quando submetidos a uma carga externa, demonstrando que os fêmures dos grupos dexametasona eram mais elásticos em decorrência da perda de massa óssea em relação ao grupo sadio. Neste contexto, o uso de curcumina (associado ou não ao simbiótico) propiciou menor perda de massa óssea. Tais dados corroboram dois estudos. Chen et al. [15] verificou os efeitos da curcumina na osteoporose induzida por dexametasona *in vivo* e apoptose de osteoblastos *in vivo* e *in vitro* e constatou

que a curcumina favoreceu a restauração de níveis séricos de fosfatase alcalina óssea e da densidade mineral óssea, demonstrando efeito protetor do tecido ósseo. Ao analisar ratos portadores de diabetes tipo 2, Liang et al. [31] também demonstrou que o consumo de curcumina preveniu a perda de massa óssea.

A diminuição da taxa de mineralização está associada a baixa resistência óssea e também a menor rigidez do osso [32]. A análise da rigidez estrutural (extrínseca) não demonstrou diferença estatística entre os grupos osteoporose, mas foi maior no grupo CT em relação aos demais, indicando que a dexametasona favoreceu a perda de massa óssea promovendo a diminuição da rigidez dos fêmures. Isso corrobora com o proposto por Adami, Saagi [2] quando relataram que o uso a longo prazo de dexametasona provocaria um desequilíbrio das atividades das células ósseas. No caso dos osteoblastos, haveria um comprometimento na formação de osso ao interferir na sua expressão gênica; no caso os osteoclastos, há um aumento na sua atividade.

A tensão é uma força externa que gera deformações variadas por unidade quadrada de área do tecido. Essas deformações podem ocorrer de várias formas. Em uma delas a tensão é suficiente para não ultrapassar o limite elástico de deformação do osso, sem gerar comprometimento permanente da sua qualidade tecidual e estrutura, permitindo o osso deformar e voltar a sua forma original. Deformações que ultrapassam este limite causam danos ao material e, conseqüentemente, comprometem a sua qualidade ao provocar micro fraturas ou fraturas parciais ou totais [33]. No presente trabalho, a tensão foi semelhante entre os grupos osteoporose, mas todos estes foram menores do que o grupo controle, mostrando que a qualidade óssea foi prejudicada. Porém, pode-se notar que o grupo OCCM apresentou a maior média absoluta entre os grupos osteoporose, sugerindo uma tendência de aumento referente a essa propriedade material. Ao considerar essa tendência, é possível mencionar que a curcumina poderia estar atuando de modo positivo para restaurar a qualidade do osso. Neste sentido, pode-se ressaltar que o tempo de tratamento utilizado no presente estudo talvez não tenha sido suficiente para mostrar diferença estatística.

Os fêmures do grupo controle apresentaram menor porcentagem de deformação relativa em relação aos outros grupos dexametasona, indicando que os grupos osteoporose tiveram sua viscoelasticidade prejudicada. Os grupos osteoporose apresentaram maior deformação relativa em relação ao grupo sadio e, tal fato, é um indicativo de que tenha ocorrido perda significativa de massa óssea e também redução da densidade mineral óssea. É interessante mencionar que o grupo OCCM deformou menos que o grupo OS, mostrando que a curcumina mitigou o efeito da dexametasona quando comparada ao uso de simbiótico. De modo análogo, o estudo de Riva et al. [34] mostrou que a osteopenia poderia ser prevenida e controlada pela suplementação com curcumina em associação com um estilo de vida saudável (exercícios físicos regulares, moderação no uso de álcool, cessação do tabagismo e alimentação balanceada). É interessante ressaltar que no referido estudo esta osteopenia é proveniente de causa natural e não do uso de qualquer tipo de GC.

O cálcio é um componente mineral marcante do osso, uma vez que seu nível alterado pode indicar uma diminuição ou aumento no módulo elástico [35]. Neste trabalho, o módulo elástico foi semelhante entre os grupos osteoporose, demonstrando que a dexametasona tornou o tecido ósseo mais elástico e menos rígido, enquanto o grupo controle sadio apresentou maior módulo em relação aos grupos OC, OS e OSC, sugerindo uma diminuição da dureza do tecido ósseo dos grupos osteoporose em virtude da perda material inorgânica, da qual o cálcio pertence [34]. O grupo OCCM apresentou a maior média absoluta de módulo elástico comparado aos demais grupos dexametasona, sugerindo que a curcumina poderia estar revertendo esta perda e gerando benefícios ao metabolismo ósseo.

O conteúdo de cálcio não mostrou diferença estatística entre os grupos osteoporose entre estes e o grupo CT. Essa semelhança entre os grupos pode ter ocorrido devido ao tempo de tratamento durante a experimentação, uma vez que a indução de osteoporose ocorre em duas fases, de modo distinto e interligado, e que são conhecidas como fases rápida e tardia. Durante a fase rápida, a estimulação acentuada da ação de osteoclastos provoca uma reabsorção óssea excessiva gerando uma diminuição da densidade mineral



óssea. Já a segunda fase, mais conhecida como fase tardia, é progressiva e apresenta um comprometimento da ação de osteoblastos e osteócitos e, conseqüentemente, prejudica a formação óssea enquanto a reabsorção está mais lenta [9].

Segundo Brown et al. [36], a fosfatase alcalina óssea é uma enzima específica liberada pelos osteoblastos no sangue durante o processo de formação óssea e que se acredita ser um indicativo do processo de mineralização óssea. Neste estudo, a fosfatase alcalina apresentou maior conteúdo no grupo OCCM em relação aos grupos OC, OS e OSC. A quantidade dessa enzima no grupo CT foi menor em relação ao grupo OCCM, porém maior em relação ao grupo OS e sem diferença estatística quando comparada aos grupos OC e OSC, indicando que a curcumina elevou a fosfatase alcalina, havendo assim, uma ação na atividade osteoblástica e no remodelamento de matriz óssea, uma vez que a fosfatase alcalina é considerada um marcador de formação e renovação óssea [37]. Chen et al. [1] descreveram que a curcumina diminuiu o efeito da dexametasona ao diminuir sua ação de inibição da capacidade proliferativa dos osteoblastos, além de regular positivamente os níveis de expressão de RNA mensageiro de fatores de transcrição que propiciam a diferenciação de osteoblastos, possibilitando assim, a formação de matriz óssea.

No presente estudo, as razões 960/1660 dos grupos osteoporose, com exceção do grupo OCCM, foram menores quando comparadas ao grupo CT, sugerindo menor taxa de mineralização dos grupos submetidos ao uso de dexametasona. Tal fato corrobora com os dados obtidos no ensaio mecânico como a menor resistência mecânica e a menor rigidez do osso, desde que a força de um osso é influenciada também por sua mineralização [32]. Deste modo, estes achados sugerem que o uso da curcumina (sem associação com o simbiótico) ameniza os danos no tecido ósseo causados pela dexametasona.

A razão 1070/1660 do grupo OCCM se mostrou maior comparado aos demais grupos osteoporose e isso pode ser um indicativo de que a taxa de *turnover* e de remodelamento ósseo estaria sendo estimulados com o consumo de curcumina. Um fato interessante observado para esta razão de Raman foi em relação ao grupo CT. Este grupo foi diferente apenas do grupo OC com

maior valor da razão 1070/1660, sugerindo que o uso de dexametasona sem o uso de qualquer tipo de suplemento (curcumina e/ou simbiótico) foi prejudicial ao metabolismo ósseo desde que os demais grupos osteoporose mantiveram suas razões semelhantes à do grupo CT. Neste contexto, pode-se dizer que os dados de Raman para esta razão corroboram com os resultados da dosagem sérica de fosfatase alcalina, a qual está relacionada com o remodelamento da matriz óssea [37].

Os resultados do presente estudo demonstraram que os animais cuja osteoporose foi induzida a partir do uso de dexametasona apresentaram comprometimento ósseo relevante nas propriedades analisadas. O consumo da curcumina beneficiou algumas dessas variáveis, enquanto o uso do simbiótico, isolado ou associado ao uso de curcumina, não demonstrou benefícios significativos. A análise da biomecânica dos fêmures dos animais que receberam a curcumina foi favorável ao aumento de formação óssea, bem como sugere que a curcumina tentou reverter à perda do conteúdo de cálcio. Com relação a ingestão de simbiótico, pode-se pensar que o modo de administração, através de gomas, não tenha sido o ideal, uma vez que a produção da goma associada ao simbiótico não foi relatada anteriormente em nenhum outro estudo. A temperatura do material para confeccionar a goma pode não ter estado em temperatura ideal para preservar a ação do simbiótico, já que outros estudos com simbiótico foram realizados através de gavagem e demonstraram efeitos positivos sobre o metabolismo do osso. Os dados de Raman demonstraram que a curcumina amenizou os efeitos causados pela dexametasona desde que manteve a taxa de mineralização e estimulou o *turnover* e o remodelamento ósseo.

Considerando os dados apresentados, foi possível verificar que a curcumina possui efeitos promissores relacionados ao aumento da resistência óssea e da mineralização, mitigando os efeitos deletérios provocados pelo uso de dexametasona quando utilizada simultaneamente com este medicamento.

## REFERÊNCIAS

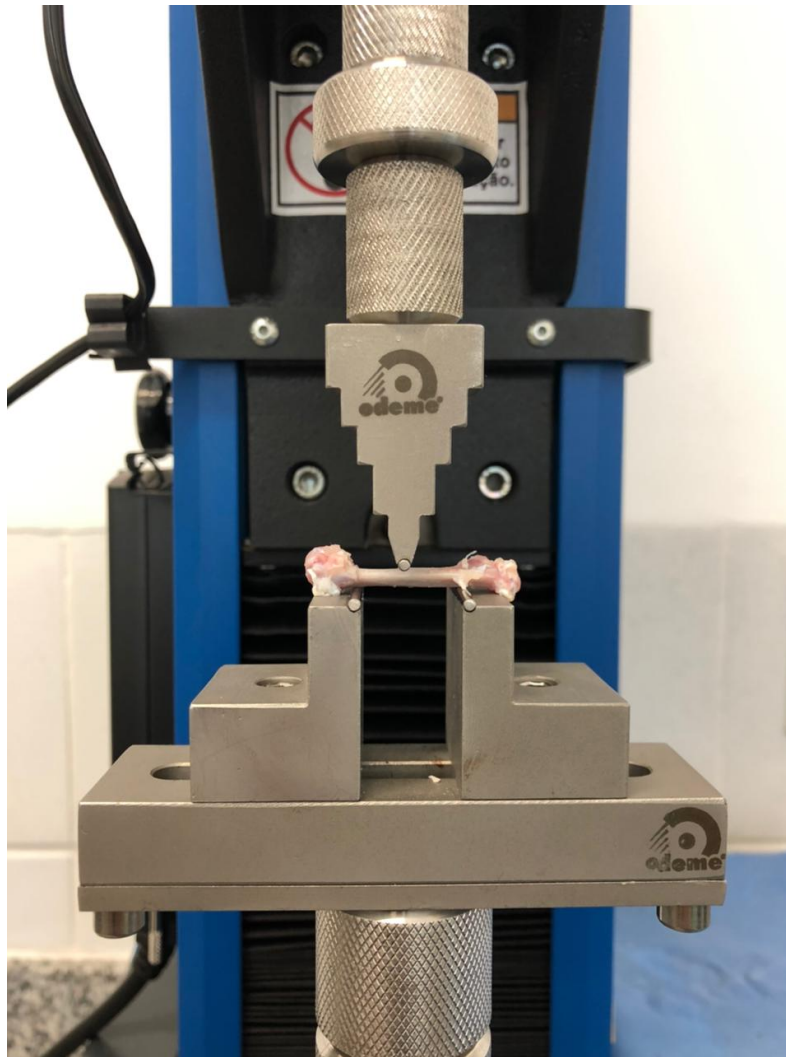
- [1] Z. Chen, J. Xue, T. Shen, S. Mu, Q. Fu, Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis through the regulation of the Wnt signaling pathway, *International Journal of Molecular Medicine*, 37 (2015), pp. 329-338, <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2432>.
- [2] G. Adami, K.G. Saag, Glucocorticoid-induced osteoporosis: 2019 concise clinical review, *Osteoporosis International*, 30 (2019), pp. 1145-1156, <https://doi.org/10.1007/s00198-019-04906-x>.
- [3] B. Lavoie, J.A. Roberts, M.M. Haag, S.N. Spohn, K.G. Margolis, K.A. Sharkey, J.B. Lian, G.M. Mawe, Gut-derived serotonin contributes to bone deficits in colitis, *Pharmacological Research*, 140 (2019), pp. 75-84, <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.07.018>.
- [4] K. Briot, P. Geusens, I. Em Bultink, W.F. Lems, C. Roux, Inflammatory diseases and bone fragility, *Osteoporosis International*, 28 (2017), pp. 3301-3314, <https://doi.org/10.1007/s00198-017-4189-7>.
- [5] B.R.R. Mattos, M.P.G. Garcia, J.B. Nogueira, L.N. Paiatto, C.G. Albuquerque, C.L. Souza, L.G.R. Fernandes, W.M.A.C. Tamashiro, P.U. Simioni, Inflammatory bowel disease: an overview of immune mechanisms and biological treatments, *Mediators of Inflammation*, 2015 (2015), pp. 493012, <https://doi.org/10.1155/2015/493012>.
- [6] P. D'Amelio, F. Sassi, Gut microbiota, immune system, and bone, *Calcified Tissue International*, 102 (2018), pp. 415-425, <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0331-y>.
- [7] C. Ohlsson, C. Engdahl, F. Fåk, A. Andersson, S.H. Windahl, H.H. Farman, S. Movérare-Skrtic, U. Islander, K. Sjögren, Probiotics protect mice from ovariectomy-induced cortical bone loss, *PloS One*, 9 (2014), p. e92368, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092368>.
- [8] K.E. Scholz-Ahrens, B. Adolphi, F. Rochat, D.V. Barclay, M. Vrese, Y. Açil, J. Schrezenmeir, Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats - impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over, *NFS Journal*, 3 (2016), pp. 41-50, <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2016.03.001>.
- [9] E. Canalis, G. Mazziotti, A. Giustina, J.P. Bilezikian, Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy, *Osteoporosis International*, 18 (2007), pp. 1319-1328, <https://doi.org/10.1007/s00198-007-0394-0>.
- [10] J-H. Byun, S. Jang, S. Lee, S. Park, H.K. Yoon, B-H. Yoon, Y-C. Ha, The efficacy of bisphosphonates for prevention of osteoporotic fracture: an update meta-analysis, *Journal of Bone Metabolism*, 24 (2017), pp. 37-49, <http://dx.doi.org/10.11005/jbm.2017.24.1.37>.

- [11] I. Siró, E. Kápolna, B. Kápolna, A. Lugasi, Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review, *Appetite*, 51 (2008), pp. 456-467, <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.05.060>.
- [12] C.A.A. Vilela, P.O. Artur, Secagem do açafrão (*Curcuma longa* L.) em diferentes cortes geométricos, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28 (2008), pp. 387-394, <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000200018>.
- [13] R. Rohanizadeh, Y. Deng, E. Verron, Therapeutic actions of curcumin in bone disorders, *Bonekey Reports*, 5 (2016), p. 793, <http://dx.doi.org/10.1038/bonekey.2016.20>.
- [14] M-W. Yang, T-H. Wang, P-P. Yan, L-W. Chu, J. Yu, Z-D. Gao, Y-Z. Li, B-L. Guo, Curcumin improves bone microarchitecture and enhances mineral density in APP/PS1 transgenic mice, *Phytomedicine*, 18 (2011), pp. 205-213, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.05.011>.
- [15] Z. Chen, J. Xue, T. Shen, G. Ba, D. Yu, Q. Fu, Curcumin alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis by protecting osteoblasts from apoptosis in vivo and in vitro, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 43 (2016), pp. 268-276, <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12513>.
- [16] L.M.F. Lucinda, B.J.V. Aarestrup, V.M. Peters, J.E.P. Reis, R.S.M.F. de Oliveira, M.O. Guerra, The effect of the Ginkgo biloba extract in the expression of Bax, Bcl-2 and bone mineral content of Wistar rats with glucocorticoid-induced osteoporosis, *Phytotherapy Research*, 27 (2013), pp. 515-520, <https://doi.org/10.1002/ptr.4747>.
- [17] E. Tagliari, A.C. Campos, T.A. Costa-Casagrande, P.R. Salvalaggio, The impact of the use of symbiotics in the progression of nonalcoholic fatty liver disease in a rat model, ABCD, *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 30 (2017), pp. 211-215, <https://doi.org/10.1590/0102-6720201700030011>.
- [18] A.M. Souza, E.S.B. Bueno, F.L.G.B. Deak, M. Fagiani, D.F.D. Reis, G.A.B. Carrera, A.J.A. Takaki, L.S.L.S. Reis, Efeito da suplementação com taurina sobre eritrograma de ratas submetidos a quimioterapia com 5-fluorouracil, *Encontro Nacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, (2020), p. 1859, <http://www.unoeste.br/Areas/Eventos/Content/documentos/EventosAnais/564/anais/Agr%C3%A1rias/Medicina%20Veterin%C3%A1ria.pdf>.
- [19] F.R. Cirano, S.P. Pimentel, M.Z. Casati, M.G. Corrêa, D.S. Pino, M.R. Messoria, P.H.F. Silva, F.V. Ribeiro, Effect of curcumin on bone tissue in the diabetic rat: repair of peri-implant and critical-sized defects, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 47 (2018), pp. 1495-1503, <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2018.04.018>.

- [20] R.N. Cassu, H. Stevanin, C. Kanashiro, L.M.B. Menezes, C.B. Laposy, Anestesia epidural com lidocaína isolada e associada ao fentanil para realização de ovariossalpingo-histerectomia em cadelas, *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60 (2008), pp. 825-831, <https://doi.org/10.1590/S0102-09352008000400008>.
- [21] M.P. Akhter, D.M. Cullen, G. Gong, R.R. Recker, Bone biomechanical properties in prostaglandin EP1 and EP2 knockout mice, *Bone*, 29 (2001), pp. 121-125, [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00486-0](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00486-0).
- [22] W.R. Nakagaki, C.A. Bertran, C.Y. Matsumura, H. Santo-Neto, J.A. Camilli, Mechanical, biochemical and morphometric alterations in the femur of mdx mice, *Bone*, 48 (2011), pp. 372-379, <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.09.011>.
- [23] C.H. Turner, D.B. Burr, Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial, *Bone*, 14 (1993), pp. 595-608, [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(93\)90081-K](https://doi.org/10.1016/8756-3282(93)90081-K).
- [24] G.S. Mandair, M.D Morris, Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength, *Bonekey Reports*, 4 (2015), p. 620, <http://dx.doi.org/10.1038/bonekey.2014.115>.
- [25] J.D. Ciubuc, M. Manciu, A. Maran, M.J. Yaszemski, E.M. Sundin, K.E. Bennet, F.S. Manciu, Raman spectroscopic and microscopic analysis for monitoring renal osteodystrophy signatures, *Biosensors (Basel)*, 8 (2018), p. 38. <https://doi.org/10.3390/bios8020038>.
- [26] M.D. Morris, G.S. Mandair, Raman assessment of bone quality, *Clin Orthop Relat Res*, 469 (2011), pp. 2160–2169. <https://doi.org/10.1007/s11999-010-1692-y>.
- [27] A.L. Pereira, F.C.B. Bolzani, M. Stefani, R. Charlín. Uso sistêmico de corticosteróides: revisão da literatura, *Med Cutan Iber Lat Am*, 35 (2007), pp. 35-50.
- [28] R. Florencio-Silva, G.R.S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M.J. Simões, P.S. Cerri, Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells, *Biomed Research International*, 2015 (2015), p. 421746, <https://doi.org/10.1155/2015/421746>.
- [29] G. Mori, P. D'amelio, R. Faccio, G. Brunetti, Bone-immune cell crosstalk: bone diseases, *Journal of Immunology Research*, 2015 (2015), pp. 1-11, <https://doi.org/10.1155/2015/108451>.
- [30] K.L. Troy, M.E. Mancuso, T.A. Butler, J.E. Johnson, Exercise early and often: effects of physical activity and exercise on women's bone health, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15 (2018), p. 878, <https://doi.org/10.3390/ijerph15050878>.

- [31] Y. Liang, B. Zhu, S. Li, Y. Zhai, Y. Yang, Z. Bai, Y. Zeng, D. Li, Curcumin protects bone biomechanical properties and microarchitecture in type 2 diabetic rats with osteoporosis via the TGF $\beta$ /Smad2/3 pathway, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20 (2020), pp. 2200-2208, <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8943>.
- [32] C.J. Hernandez, G.S. Beaupré, T.S Keller, D.R. Carter, The influence of bone volume fraction and ash fraction on bone strength and modulus, *Bone*, 29 (2001), pp. 74-78, [http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00467-7](http://dx.doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00467-7).
- [33] N.H. Hart, S. Nimphius, T. Rantalainen, A. Ireland, A. Siafarikas, R.U. Newton, Mechanical basis of bone strength: influence of bone material, bone structure and muscle action, *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 17 (2017), pp. 114-139.
- [34] A. Riva, S. Togni, L. Giacomelli, F. Franceschi, R. Eggenhoffner, B. Feragalli, G. Belcaro, M. Cacchio, H. Shu, M. Dugall, Effects of a curcumin-based supplementation in asymptomatic subjects with low bone density: a preliminary 24-week supplement study, *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 21 (2017), pp. 1684-1689.
- [35] A.H. Burstein, J.M. Zika, K.G. Heiple, L. Klein, Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone, *The Journal of Bone and Joint Surgery American*, 57 (1975), pp. 956-961.
- [36] J.P. Brown, C. Albert, B.A. Nassar, J.D. Adachi, D. Cole, K.S. Davison, K.C. Dooley, A. Don-Wauchope, P. Douville, D.A. Hanley, S.A. Jamal, R. Josse, S. Kaiser, J. Krahn, R. Krause, R. Kremer, R. Lepage, E. Letendre, S. Morin, D.S. Ooi, A. Papaioannou, L-G Ste-Marie, Bone turnover markers in the management of postmenopausal osteoporosis, *Clin Biochem*, 42 (2009), pp. 929-942, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.04.001>.
- [37] S.M. Lim, Y.N. Kim, K.H. Park, B. Kang, H.J. Chon, C. Kim, J.H. Kim, S.Y. Rha, Bone alkaline phosphatase as a surrogate marker of bone metastasis in gastric cancer patients, *BMC Cancer*, 16 (2016), p. 385, <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2415-x>.

## APÊNDICES

**APÊNDICE A – Imagem Teste Mecânico**

Fêmur posicionado no equipamento de ensaio mecânico INSTRON (modelo EMIC 23-2S), com célula de carga de 100 Kgf. A distância entre os 2 suportes inferiores foi de 17mm.



## APÊNDICE B – Preparação da Goma



Fonte: O autor.

**ANEXOS**

## ANEXO A – Normas Revista *BONE*

### Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

### *Types of article*

Types of articles Bone accepts include:

- 1) Memoriam
- 2) Editorial or Commentary
- 3) Review
- 4) Original Articles
- 5) Rapid Communication
- 6) Case Report
- 7) Technical Note
- 8) Letters and Response to Letter to the Editor
- 9) Erratum/Corrigendum
- 10) Announcements

There are no length or format requirements other than those already shown on the GFA under Article Structure.

### Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

### Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)  
*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### **Studies in humans and animals**

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex](#) and [gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

### ***Preprints***

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### **Use of inclusive language**

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

## **Author contributions**

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. [More details and an example](#)

## **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

## **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

## ***Article transfer service***

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

## **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a

'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

**Author rights:** As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

#### ***Elsevier supports responsible sharing***

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

**Role of the funding source:** You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

#### **Open access**

Please visit our Open Access page for more information.

**Elsevier Researcher Academy:** Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

#### ***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

## **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

## **Referees**

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **NEW SUBMISSIONS**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

## **References**

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

## **Formatting requirements**

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.



**Figures and tables embedded in text**

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

**Peer review**

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

**REVISED SUBMISSIONS**

**Use of word processing software:** Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

**Article structure**

**Subdivision - numbered sections:** Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

**Introduction**

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

**Material and Methods**

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should

be described. Since there are significant differences in skeletal structure and remodeling between the sexes and strains, it is essential that all animal studies report the age, sex, and strain (e.g., C57BL/6) of animals used.

### **Key Resources Table**

To enable reproducibility of the research, we encourage authors to submit a Key Resources Table, which helps make the resources clear to readers. The Key Resources Table highlights the genetically modified organisms and strains, cell lines, reagents and other resources essential to reproduce the results presented in a paper. More information is available here <https://www.elsevier.com/authors/author-resources/key-resources-table>

### **Theory/calculation**

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

### **Results**

Results should be clear and concise.

### **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### **Conclusions**

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

## Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

## Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site. Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

## Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only

abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### ***Abbreviations***

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### ***Acknowledgements***

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### ***Formatting of funding sources***

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Genbank**

#### ***Footnotes***

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

#### ***Electronic artwork***

##### ***General points***

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'. TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi. TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

### ***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., Science Direct and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

### ***Illustration services***

[Elsevier's Author Services](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images

accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

### ***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### **References**

#### ***Citation in text***

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### ***Reference links***

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M.

(2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### ***Web references***

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### ***Data references***

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### ***References in a special issue***

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### ***Reference management software***

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software. Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/bone>.

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

***Reference formatting:*** There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as

the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

### **Reference style**

*Text:* Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result ....'

*List:* Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

<https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

[3] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK, Cancer statistics reports for the UK.

<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [6] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

### **Journal abbreviations source**

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.



## Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

**Supplementary material:** Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

## Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

### **Data linking**

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### **Mendeley Data**

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

### **Data statement**

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

### **Online proof correction**

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and

answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

## ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética

Certificado

19/11/2020 15:54

### UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PPG - Programa de Pesquisa de Pós-Graduação  
PEIC - Programa Especial de Iniciação Científica

## Parecer Final

Declaramos para os devidos fins que o Projeto de Pesquisa intitulado "ANÁLISE DOS EFEITOS DO CONSUMO DE CÚRCUMA E DE SIMBIÓTICO EM OSSOS DE RATOS SUBMETIDOS AO USO DE GLICOCORTICOIDE", cadastrado na Coordenadoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (CPDI) sob o número nº 5893 e tendo como participante(s) JULIA APARECIDA GALDINO TORRALBA (discente), MARIANA DAUDT NEVES (discente), GLEICY FERNANDA SOARES SAMPAIO (discente), WILSON ROMERO NAKAGAKI (orientador responsável), foi avaliado e APROVADO pelo COMITÊ ASSESSOR DE PESQUISA INSTITUCIONAL (CAPI) e COMISSÃO DE ÉTICA USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE de Presidente Prudente/SP.

Este Projeto de Pesquisa, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de Julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido APROVADO em reunião realizada em 11/12/2019.

Vigência do projeto: 02/2020 a 02/2021.

#### ANIMAL VIVO

Espécie/Linhagem	Nº de Animais	Peso	Idade	Sexo	Origem
Rattus norvegicus (Wistar)	50	250 gramas	60 dias	F	Biotério Central - UNOESTE

Presidente Prudente, 15 de Abril de 2020.

Prof. Dr. Jair Rodrigues Garcia Jr.  
Coordenador Científico da CPDI

Prof. Ms. Adriana Falco de Brito  
Coordenadora da CEUA - UNOESTE  
Coordenadora de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação - CPDI - 18 3229-2079 - cpdi@unoeste.br  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP - 18 3229-2079 - cep@unoeste.br  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - 183229-2079 - ceua@unoeste.br

valide este documento em [www.unoeste.br/sgp](http://www.unoeste.br/sgp) informando o código de segurança da183edda8ca85268134a202e29ccc54