

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ – UFPI  
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA – RENORBIO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**KARINNE SOUSA DE ARAÚJO**

**REPARAÇÃO ÓSSEA COM UTILIZAÇÃO DE COLÁGENO E COMPOSTOS DE  
URUCUM (*Bixa orellana* L.) EM *Rattus norvegicus***

**TERESINA**

**2017**

**KARINNE SOUSA DE ARAÚJO**

**REPARAÇÃO ÓSSEA COM UTILIZAÇÃO DE COLÁGENO E COMPOSTOS DE  
URUCUM (*Bixa orellana* L.) EM *Rattus norvegicus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, ponto focal na Universidade Federal do Piauí – UFPI em cumprimento às exigências para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Rômulo José Vieira

**TERESINA**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

A663r      Araújo, Karinne Sousa de.  
Reparação óssea com utilização de colágeno e  
compostos de urucum (*Bixa orellana* L.) em *Rattus*  
*norvegicus* / Karinne Sousa de Araújo. – 2017.  
63 f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de  
Pós-Graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia,  
Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.  
“Orientador: Prof. Dr. Rômulo José Vieira”.

1. Biotecnologia. 2. *Bixa orellana*. 3. Colágeno.  
4. Osso. 5. Espectroscopia Raman. I. Título.

CDD 660.6

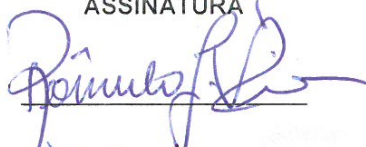
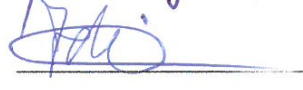
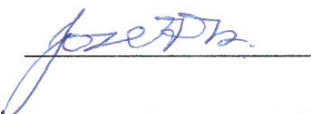
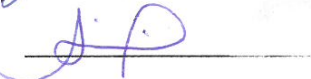
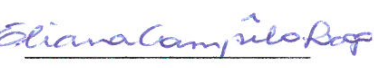
## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: KARINNE SOUSA DE ARAÚJO

TÍTULO DO PROJETO: "REPARAÇÃO ÓSSEA COM UTILIZAÇÃO DE COLÁGENO E COMPOSTOS DE URUCUM (Bixa orellana L.) EM Rattus Norvegicus."

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Rômulo Jose Vieira

BANCA EXAMINADORA:

	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Rômulo Jose Vieira (Presidente)	Satisfatório	
Prof. Dr. Francisco das Chagas Alves Lima - UESPI (Examinador)	Satisfatório	
Prof. Dr. José Ferreira Nunes - UECE (Examinador)	Satisfatório	
Profa. Dra. Andréa Conceição Gomes Lima – UESPI (Examinadora)	Satisfatório	
Profa. Dra. Eliana Campêlo Lago - UNINOVAFAPÍ (Examinadora)	Satisfatório	

DATA DA AVALIAÇÃO: 03 de agosto de 2017.

HORÁRIO: 14:00h

LOCAL: Auditório do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco  
(NUPCelt/UFPI)

***À minha amada família:***

*Meus pais, José Nerivaldo de Araújo e Maria do Socorro Sousa de Araújo;*

*Sammara Jericó Alves Feitosa;*

*Ingrid Sousa de Araújo; Ilanne Sousa de Araújo;*

*Valentina de Araújo Miranda e Adele de Araújo Miranda;*

*pelo amor incondicional e apoio irrestrito na minha vida.*

***A vocês, o meu amor infinito.***

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus, autor do meu destino, pelo dom da vida. E à Nossa Senhora de Fátima, por iluminar os meus caminhos.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Rômulo José Vieira, pelo apoio e incentivo, pelo carinho e respeito, sobretudo por acreditar em minha capacidade. “Você semeou em mim a semente da pesquisa. Regou essa semente com cuidados de mestre... E se hoje posso colher algum fruto, foi porque suas lições permaneceram...”*

*À minha prima, Ísidra Manoela Sousa Portela, companheira dessa e de tantas jornadas. Sua amizade, cumplicidade e apoio tornaram essa caminhada mais simples. Você é coautora desta conquista.*

*Ao amigo Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho, pela amizade, presença, suporte e parceria de sempre.*

*Ao Prof. Dr. José de Sousa Lima Neto, pela valiosa colaboração e imenso desprendimento em ajudar.*

*Ao Prof. Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão e Prof. Dr. Cleânio da Luz Lima, pela assistência e preciosa colaboração.*

*Ao professor e ex-coordenador do Ponto Focal na UFPI, Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior, pelo apoio e contribuição para o desenvolvimento da pesquisa.*

*Ao Prof. Vicente Galber Freitas Viana, pela colaboração.*

*Aos meus queridos ex-alunos, Samuel Oliveira Costa, Francisco Junio da Rocha Araújo e Ana Carolina Bezerra Ribeiro pela atenção e participação no desenvolvimento desta pesquisa.*

*Aos técnicos de laboratório, Talvany Barros, Esmeralda Barros, Dianara Castro, Silvana Freire e Ana Cláudia, pela dedicação e contribuição para o desenvolvimento dos experimentos.*

*A todos os professores que compartilharam seus saberes e me fizeram ir mais longe. Levo a impressão de valores eternos em minha alma.*

*Aos colegas de pós-graduação, que juntos caminhamos e aprendemos a superar as adversidades.*

*À Direção da DeVry/Facid pelo incentivo à qualificação profissional e apoio à pesquisa científica.*

*Aos funcionários do ponto focal UFPI, pela atenção e presteza.*

*À equipe do Laboratório de Geoquímica Orgânica – LAGO/UFPI, no nome da Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Citó, pela disponibilização do equipamento e insumos para análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas.*

*À equipe do Laboratório de Física de Materiais/UFPI, no nome do Prof. Dr. Bartolomeu Cruz Viana Neto, pela disponibilização do equipamento para análise por Microscopia Confocal Raman.*

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.*

Leonardo da Vinci



**ARAÚJO, K. S.** Reparação óssea com utilização de colágeno e compostos de urucum (*Bixa orellana* L.) em *Rattus norvegicus*. 2017. 63 p. Tese orientada pelo Prof. Dr. Rômulo José Vieira (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

## RESUMO

Visando a obtenção de biomateriais que favoreçam a reparação óssea, materiais poliméricos biocompatíveis, como o colágeno, têm sido amplamente estudados. Também tem sido investigada a utilização de produtos naturais, como os carotenoides (bixina, norbixina, dimetil- $\beta$ -caroteno) extraídos do urucum, que apresentam efeitos antioxidante e anti-inflamatório. A pesquisa objetivou avaliar a reparação óssea com utilização de enxerto de colágeno associado a compostos extraídos de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) em modelo experimental na tíbia de *Rattus norvegicus*. Foram extraídos compostos das sementes do urucum com KOH 4% e foi determinado o teor dos constituintes químicos majoritários identificados no extrato por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM) após reação de derivatização. Foram utilizados 40 ratos divididos em quatro grupos. Foi produzido defeito ósseo de 2 mm na tíbia. No G1, a ferida óssea foi preenchida com coágulo; G2, com colágeno; G3, com o extrato seco do urucum e no G4, com colágeno/urucum 1:1. Após eutanásia, em 14 e 30 dias, as amostras das tíbias foram encaminhadas para análise histológica e por espectroscopia Raman. Obteve-se um extrato seco das sementes de *Bixa orellana* L. contendo os carotenoides norbixina (26,55%), bixina (25,82%) e dimetil- $\beta$ -caroteno (4,12%), os quais juntos representam 56,59% dos constituintes identificados pela CG-EM. A análise microscópica demonstrou que o G1 apresentou reação inflamatória moderada aos 14 e 30 dias. Nos grupos G3 e G4, no entanto, observou-se uma redução na densidade do infiltrado inflamatório. Foi verificado que os G2, G3 e G4 apresentaram melhor qualidade de osso neoformado aos 14 e 30 dias pós-cirúrgico na análise por microscopia óptica. A análise Raman demonstrou que G4 apresentou média das razões entre os picos  $960\text{ cm}^{-1}$  e  $1070\text{ cm}^{-1}$  significativamente maior quando comparado a média do G1. Além disso, o G4 foi estatisticamente semelhante ao osso hígido. Os compostos majoritários extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) com KOH 4% são carotenoide norbixina, bixina e dimetil- $\beta$ -caroteno. O extrato obtido apresenta efeito anti-inflamatório e osteoindutor; e quando

associado ao colágeno, promove mineralização da matriz óssea neoformada semelhante à encontrada no osso hígido na análise por espectroscopia Raman. Nas condições apresentadas neste estudo, a reparação óssea em modelo experimental na tíbia de *Rattus norvegicus* é favorecida com a utilização de compostos de urucum (*Bixa orellana* L.) associado ao colágeno.

**Palavras-chave:** *Bixa orellana*. Osso. Colágeno. Espectroscopia Raman.

**ARAÚJO, K. S.** Bone repair with use of collagen and annatto compounds (*Bixa orellana* L.) in *Rattus norvegicus*. 2017. 63 p. Thesis oriented by MSc. PhD. Rômulo José Vieira (Doctorate in Biotechnology) - Federal University of Piauí, Teresina, 2017.

## ABSTRACT

Biocompatible polymeric materials, such as collagen, have been widely studied in order to obtain biomaterials that favor bone repair. Natural products have also been used, such as carotenoids (bixin, norbixin, dimethyl- $\beta$ -carotene) extracted from annatto, which have antioxidant and anti-inflammatory effects. This study aimed to evaluate the bone repair using collagen graft associated with compounds extracted from annatto seeds (*Bixa orellana* L.) in experimental model using tibia of *Rattus norvegicus*. The compounds of the annatto seeds were extracted with 4% KOH, and the content of the major chemical constituents identified by GC/MS in the extract after derivatization reaction was determined. It was used 40 rats divided into four groups. It was produced a bone defect of 2 mm in the tibia. In G1, the bone wound was filled with clot; G2, with collagen; G3, with compounds extracted from annatto; G4, with collagen/annatto 1:1. After euthanasia, at 14 and 30 days, the tibia samples were submitted to histological analysis and Raman spectroscopy. A dry extract of the seeds of *Bixa orellana* L. containing the carotenoids norbixin (26.55%), bixin (25.82%) and dimethyl- $\beta$ -carotene (4.12%) were obtained, which together represent 56,59% of the constituents identified by GC-MS. Microscopic analysis showed that G1 presented a moderate inflammatory reaction at 14 and 30 days. In the G3 and G4 groups, however, a reduction in the density of the inflammatory infiltrate was observed. It was verified that the G2, G3 and G4 presented better quality of neofomed bone at 14 and 30 postoperative days. The Raman analysis showed that G4 presented a mean of the ratios between the peaks  $960\text{ cm}^{-1}$  and  $1070\text{ cm}^{-1}$  significantly higher when compared to the G1 average. In addition, G4 was statistically similar to healthy bone. The major compounds extracted from urucum (*Bixa orellana* L.) with 4% KOH are carotenoids norbixin, bixin and dimethylcarotene. The extract obtained showed anti-inflammatory and osteoinductive effect. And when associated with collagen, promoted mineralization of the neofomed bone matrix similar to that found in normal bone in Raman spectroscopy. Under the conditions presented in this study, bone repair in an

experimental model in the tibia of *Rattus norvegicus* is favored with the use of compounds of annatto (*Bixa orellana* L.) associated with collagen.

**Keywords:** *Bixa orellana*. Bone. Collagen. Raman spectroscopy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado do processo de remodelação óssea.....	19
Figura 2 – Planta, frutos e sementes do urucuzeiro ( <i>Bixa orellana</i> L.) .....	26
Figura 3 – Estrutura química da bixina e da norbixina.....	27
Figura 4 – Processo de extração de carotenoides do urucum.....	35
Figura 5 – Preparo cirúrgico dos defeitos ósseos.....	37
Figura 6 – Biomateriais utilizados para enxertia óssea.....	38
Figura 7 – Procedimentos de intervenção terapêutica.....	38
Figura 8 – Preparo das amostras das tíbias.....	39
Figura 9 – Microscópio Confocal Raman.....	41
Figura 10 – Fotomicrografia confocal Raman da tíbia seccionada.....	41
Figura 11 – Cromatograma de íons totais do extrato sililado de <i>Bixa orellana</i> por análise em CG-EM.....	43
Figura 12 – Espectros de massas e estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados por CG-EM em extrato de <i>Bixa orellana</i> após reação de derivatização.....	44
Figura 13 – Fotomicrografia do reparo ósseo dos grupos experimentais aos 14 dias pós-cirurgia.....	46
Figura 14 – Fotomicrografia do reparo ósseo dos grupos experimentais aos 30 dias pós-cirurgia.....	48
Figura 15 – Espectro Raman do osso, mostrando os picos $960\text{ cm}^{-1}$ e $1070\text{ cm}^{-1}$ .....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
BSTFA	[bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida]
$\text{Ca}^{2+}$	Cálcio
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
$\text{cm}^{-1}$	Inverso de centímetro
CoQ	Coenzima Q
Da	Dalton
ERN	Espécies Reativas de Oxigênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
g	Gramas
H.E	Hematoxilina-eosina
IL	Interleucina
KOH	Hidróxido de Potássio
m	Metro
mg	Micrograma
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mW	Milwatt
n°	Número
$\text{N}_2$	Nitrogênio
$\text{NaHCO}_3$	Bicarbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
$\text{NH}_4\text{OH}$	Hidróxido de Amônio
°C	Grau Celsius
TMCS	Trimetilclorosilano
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrometro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
<b>3.1 Tecido Ósseo</b> .....	17
3.1.1 <i>Características gerais, matriz óssea e tipos celulares</i> .....	17
3.1.2 <i>Reparação óssea</i> .....	20
3.1.3 <i>Espectroscopia Raman no osso</i> .....	21
<b>3.2 Colágeno como Biomaterial para Enxertia Óssea</b> .....	23
<b>3.3 <i>Bixa Orellana L.</i></b> .....	25
3.3.1 <i>Caracterização botânica e composição</i> .....	25
3.3.2 <i>Extração e método cromatográfico para análise de compostos da <i>Bixa orellana L.</i></i> .....	27
3.3.3 <i>Propriedades biológicas da <i>Bixa orellana L.</i></i> .....	30
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	34
<b>4.1 Aspectos Éticos</b> .....	34
<b>4.2 Obtenção de Compostos do Urucum</b> .....	34
4.2.1 <i>Extração de carotenoides do urucum</i> .....	34
4.2.2 <i>Reação de derivatização por silição e aplicação da CG-EM</i> .....	35
<b>4.3 Ensaio Biológico de Reparação Óssea</b> .....	36
4.3.1 <i>Seleção e manejo dos animais</i> .....	36
4.3.2 <i>Preparo cirúrgico dos defeitos ósseos</i> .....	37
4.3.3 <i>Intervenção terapêutica</i> .....	37
4.3.4 <i>Eutanásia e descarte dos animais</i> .....	39
4.3.5 <i>Análise por microscopia óptica</i> .....	39
4.3.6 <i>Análise por microscopia confocal Raman</i> .....	40
4.3.7 <i>Análise estatística</i> .....	42
<b>5 RESULTADOS</b> .....	43
<b>5.1 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectômetro de Massas por Derivatização</b> .....	43
<b>5.2 Análise por Microscopia Óptica</b> .....	45
<b>5.3 Análise por Microscopia Confocal Raman</b> .....	48
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>ANEXOS</b>	

## 1 INTRODUÇÃO

Os avanços científicos e tecnológicos ocorridos nos últimos anos têm proporcionado um aumento considerável de pesquisas na área de Bioengenharia Tecidual, bem como na síntese e utilização de biomateriais para a reconstrução de órgãos e/ou para estimulação da reparação tecidual (SANTOS et al., 2013). Os processos de reparação óssea, assim como materiais e técnicas utilizados para a sua otimização são uma constante preocupação na área médica e odontológica (PEREIRA, 2011).

A utilização de enxertos cirúrgicos derivados de polímeros é uma alternativa factível para a reparação tecidual, pois estes materiais apresentam de um modo geral, biocompatibilidade, biodegradabilidade, processabilidade, flexibilidade e baixo custo de fabricação em relação aos demais biomateriais (MARÃO et al., 2011; SANTOS et al. 2014).

O colágeno é um polímero natural que provém de várias estruturas orgânicas, como pele, tendão e osso, e pode ser processado para a obtenção de formulações em pó, esponjas, membranas e matrizes (NAGEM FILHO et al., 2009). É um biomaterial que vem sendo empregado como material osteocondutor, pois quando colocado em uma ferida óssea, serve de arcabouço para o desenvolvimento de novo tecido ósseo; assim como material carreador, com objetivo de aumentar a exposição dos tecidos a biomateriais osteoindutores e assegurar uma distribuição uniforme destes sem permitir que ultrapassem os limites do sítio cirúrgico (OAKES; LEE; LIEBERMAN, 2003; RENGACHARY, 2002).

O urucum (*Bixa orellana* L.) é uma planta nativa da América Tropical largamente utilizado como corante natural em muitos alimentos processados. As suas sementes são uma rica fonte de pigmentos alaranjados compostos por uma mistura de carotenoides, como a bixina, norbixina e  $\beta$ -caroteno (FRANCO et al., 2017). Pesquisas *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os carotenoides têm propriedades antioxidante, anti-apoptótica e anti-inflamatória (AGNER et al., 2005; KAULMANN; BOHN, 2014). Além disso, os carotenoides têm mostrado efeito benéfico no osso, tanto na atividade osteoclástica quanto modulando os osteoblastos *in vitro* (KIM et al., 2003; RAO; RAO, 2007).

Estudos têm demonstrado a utilização de produtos naturais a fim de favorecer o processo de reparação óssea (ALMEIDA et al., 2010; BLOKHUIS; ARTS, 2011;



GARCÍA-GARETA et al., 2015; MARÃO et al., 2011; SANTOS et al. 2014). No entanto, não foi descrita na literatura pesquisa experimental que explore a utilização de compostos do urucum (*Bixa orellana* L.) associado ao colágeno para aplicação em reparação óssea em modelo animal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a reparação óssea com utilização de enxerto de colágeno associado a compostos de urucum (*Bixa orellana L.*) em modelo experimental na tíbia de *Rattus norvegicus*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Extrair compostos das sementes do urucum (*Bixa orellana L.*) com solução salina de KOH 4%;
- Determinar os compostos majoritários extraídos das sementes do urucum por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas;
- Verificar o efeito de enxerto de colágeno associado a compostos extraídos do urucum por meio de análise histopatológica;
- Comparar a mineralização do osso neoformado com o osso hígido a partir da informação espectral fornecida pela microscopia confocal Raman.

## 3 REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1 Tecido Ósseo

#### 3.1.1 Características gerais, matriz óssea e tipos celulares

O esqueleto humano é formado estruturalmente por ossos, os quais constituem aproximadamente 20% da massa corporal. Funcionalmente, apresentam papel importante no suporte de tecidos moles, na proteção anatômica de órgãos vitais (tais como cérebro, coração e pulmões), alojam o tecido hematopoiético, armazenam íons (como o  $\text{Ca}^{2+}$ ) importantes em vários processos metabólicos, e associados aos músculos estriados, compõem o sistema locomotor que propicia a coordenação de movimentos voluntários e ampliação da força muscular (MOTA et al, 2008).

Os ossos são formados por tecido ósseo que é um tipo de tecido conjuntivo especializado e está sob o controle de fatores sistêmicos, a exemplo de hormônios, e fatores locais, como fatores de crescimento e citocinas (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006). O tecido ósseo não é completamente dúctil nem frágil, mas uma combinação dessas características (DINIZ et al., 2009). É um tecido conjuntivo altamente vascularizado constituído por uma matriz extracelular mineralizada composta por uma porção orgânica e uma porção inorgânica (VO et al, 2017).

O componente orgânico corresponde a 35% da matriz óssea e proporciona maleabilidade tecidual, sem perder clinicamente a dureza, responsável pela resistência à fratura, compressão e tração. O componente inorgânico, que constitui 65% da matriz, confere ao tecido ósseo resistência à deformação (DALMOLIN et al., 2013).

A parte orgânica da matriz óssea, também denominada osteoide, é formada por fibras colágenas (colágeno do tipo I), fibras elásticas, glicosaminoglicanos, proteoglicanas e glicoproteínas de adesão (como a osteocalcina, a osteopontina e a sialoproteína do osso). Já a parte inorgânica é constituída principalmente por íons de cálcio e fosfato, os quais estão sobretudo na forma de cristais de hidroxiapatita. Além desses, são encontrados outros íons compondo a matriz, como carbonato, magnésio, sódio e potássio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Inicialmente, a matriz é formada por colágeno tipo I que é uma proteína sintetizada por osteoblastos. Durante os estágios posteriores da osteogênese, a

matriz neoformada vai se tornando mineralizada com a incorporação de hidroxiapatita. Portanto, quanto maior a deposição da matriz orgânica, mais mineralização ocorre na mesma (MAIA FILHO et al., 2014).

As células do tecido ósseo provêm de duas linhagens de células mesenquimais embrionárias, que se diferenciam a partir de processos distintos de diferenciação. Uma relacionada à síntese e manutenção da integridade do tecido ósseo: células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos; e outra, à reabsorção óssea: osteoclastos (ANDIA et al., 2006).

As células osteoprogenitoras, também chamadas células-tronco do adulto ou “células-fonte”, surgem a partir da contração dos prolongamentos citoplasmáticos e diminuição de volume total da célula mesenquimal. No tecido ósseo, estas células são estimuladas à proliferação e à diferenciação quando as células maduras chegam ao término de sua vida-útil ou quando estimuladas bioquimicamente na consolidação de fissuras ou fraturas ou em condições patológicas como neoplasias ou hiperplasias ósseas reacionais (MOTA et al., 2008). Estas células estão presentes em todas as superfícies não-reabsorvidas (periósteo e endósteo) e possuem a função de se diferenciar em osteoblastos (ANDRADE et al., 2007).

Os osteoblastos, também de origem mesenquimal, são células mononucleadas, com núcleo esférico e citoplasma basófilo. São as células responsáveis pela produção dos componentes orgânicos da matriz extracelular, bem como participam do processo de mineralização da matriz óssea. Quando estão em síntese, são cuboides ou ligeiramente alongadas e formam uma camada celular contínua sobre a superfície óssea que está sendo formada (osteóide). Sintetizam várias proteínas colágenas e não colágenas, tais como colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, proteoglicanas, fosfoproteínas e citocinas, que constituem a matriz orgânica (ANDIA et al, 2006).

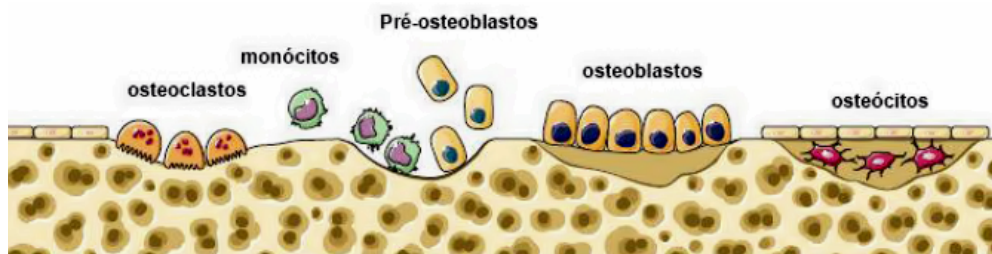
À medida que os osteoblastos secretam a parte orgânica da matriz óssea, ficam aprisionados no seu interior, dentro de uma lacuna, e são denominados osteócitos (Figura 1). Interligando as lacunas, existem canalículos, nos quais atravessam os prolongamentos citoplasmáticos dos osteócitos, que possibilitam a difusão de nutrientes e permitem a comunicação entre estas células. Os osteócitos são células quiescentes, com reduzida atividade sintética e secretora, porém são as mais abundantes no tecido ósseo, em uma proporção de 10 osteócitos para cada

osteoblasto. Mantendo assim um papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea (KATCHBURIAN; ARANA, 2004).

A partir de outra linhagem das células indiferenciadas do mesênquima, surgem os hemocitoblastos, que dão origem aos elementos celulares do sangue. Dentre estes, os monócitos hematopoiéticos, responsáveis pelo sistema fagocitário mononuclear. Desta linhagem de células surgem os osteoclastos, que são especializados na reabsorção da matriz óssea. Os osteoclastos são células multinucleadas, regulados por fator estimulador da colônia de monócitos, fator de diferenciação dos osteoclastos, interleucinas (IL), vitamina D3, fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e partículas ósseas mineralizadas contendo osteocalcina (MOTA et al., 2008).

As diferenças entre as atividades osteoclástica e osteoblástica podem ser originadas de uma grande variedade de mudanças hormonais ou perturbações nos processos inflamatórios e nos fatores de crescimento (ANDRADE et al. 2007).

**Figura 1- Esquema simplificado do processo de remodelação óssea**



Fonte: TORMENA (2009)

Estruturalmente, o tecido ósseo pode se apresentar como compacto, na região mais periférica dos ossos, denominada cortical; e esponjoso ou trabeculado, contendo rede de trabéculas permeadas por espaços intercomunicantes que abrigam a medula óssea (DALMOLIN et al., 2013).

Microscopicamente, o tecido ósseo pode ser classificado em primário (imaturo) e secundário (maduro, haversiano ou lamelar). O tecido ósseo primário se apresenta com fibras colágenas não organizadas, com disposição irregular e menor quantidade de cristais de hidróxiapatita. Este tipo de tecido ósseo é encontrado nos centros de ossificação e no calo ósseo. Já o tecido ósseo secundário (maduro, haversiano ou lamelar) é formado por fibras colágenas dispostas em lamelas paralelas ou

concêntricas em torno dos canais de Harvers. É mais rígido, mais resistente e mais mineralizado do que o tecido ósseo primário (ANDIA et al., 2006).

As superfícies ósseas internas e externas são revestidas, respectivamente, pelo endóstio e perióstio, que são membranas conjuntivas, as quais possuem células osteoprogenitoras e osteoblastos importantes para a manutenção e reparo do tecido (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

### 3.1.2 *Reparação óssea*

O ser humano não poderia sobreviver no seu ambiente sem as respostas protetoras da inflamação e reparação. Este é o processo pelo qual, células perdidas ou destruídas são substituídas por novas células (GENOVESE, 2007).

Por meio da reparação óssea, a estrutura e função original do osso lesado são restauradas. É um processo complexo, composto por eventos celulares e extracelulares, que se estabelecem em um estado dinâmico de constante remodelação (Figura 1), por meio da síntese, deposição e reabsorção da matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Para que haja a integridade na formação de tecido ósseo é fundamental que se instaure um equilíbrio entre o processo fisiológico de formação e reabsorção. Necessitando, desta forma, haver ausência de necrose e infiltrado inflamatório, além de estabilidade entre a atividade dinâmica osteoblasto/osteoclasto (PEREIRA et al, 2011).

A inflamação é um processo patofisiológico que ocorre imediatamente em resposta às injúrias nos tecidos vascularizados. Durante o processo inflamatório, ocorre a formação de radicais livres, os quais em excesso são prejudiciais às células, pois induzem eventos como a peroxidação de lipídeos da membrana, agressão a proteínas das membranas e intersticiais, enzimas, carboidratos e DNA. Os radicais livres estão associados a vários problemas de saúde, por isso faz-se necessário que o organismo tenha antioxidantes para combatê-los. Compostos antioxidantes podem diminuir o estresse oxidativo, minimizando a incidência de danos teciduais (NUNES; ABREU, 2012).

No ínterim da reparação óssea, ocorre a migração e proliferação de células indiferenciadas do endóstio/perióstio, que se diferenciam em osteoblastos. Em condições normais, a neoformação óssea, se dá inicialmente por um aumento da

atividade secretora destas células, formando rapidamente tecido ósseo imaturo; seguida pela deposição de minerais, principalmente hidroxiapatita. Essa reparação tecidual ocorre de forma centrípeta, ou seja, da periferia para o centro do defeito ósseo, devido à proximidade da fonte de novas células. (PORTINHO et al., 2008).

A princípio, a atividade osteoblástica é principalmente proliferativa. A síntese e deposição de matriz óssea com posterior incorporação por hidroxiapatita ocorre mais tardiamente (LOPES et al., 2007).

Os osteoclastos protagonizam a fase final da reparação óssea, que corresponde à remodelação do tecido ósseo em sua configuração original. Dessa forma, a reparação óssea constitui-se de uma complexa sequência de eventos moleculares e celulares que atuam de forma coordenada para restaurar as estruturas danificadas por traumatismos e doenças. Sendo assim, é um processo essencial para a manutenção da homeostasia dos organismos vivos (BOSSHARDT; SCHENK, 2009).

Três diferentes mecanismos biológicos podem levar ao processo de neoformação óssea: a osteogênese, a osteocondução e a osteoindução. A osteocondução pode ser definida como a habilidade de um material servir como arcabouço, mantendo as dimensões do defeito ósseo para que haja a formação óssea nos espaços adjacentes a esse material (ALVES et al., 2014; GARCÍA-GARETA et al., 2015). A osteoindução é o processo pelo qual células mesenquimais pluripotentes e células osteoprogenitoras são induzidas a diferenciarem-se em osteoblastos, que então proliferam e produzem matriz mineralizada (MORATO et al, 2017).

### *3.1.3 Espectroscopia Raman no osso*

A qualidade óssea é interpretada pelas propriedades composicionais e arquitetônicas do tecido ósseo, que juntas determinam suas características morfofuncionais. Técnicas de espectroscopia vibracional, como a espectroscopia Raman, para análise da qualidade do osso neoformado em processos de reparação óssea vêm sendo amplamente empregadas. A espectroscopia Raman gera informações importantes sobre a constituição de componentes orgânicos e inorgânicos das amostras analisadas, pois mede as frequências vibracionais características das moléculas que as constituem, possibilitando análises qualitativas e quantitativas não destrutivas. Dessa forma, a informação espectral fornecida pela

espectroscopia Raman permite uma boa avaliação dos componentes químicos do osso e tem se tornado uma ferramenta poderosa para avaliar a qualidade do osso em processos de reparação óssea (MAIA FILHO et al., 2014).

A espectroscopia Raman é uma técnica de espectroscopia vibracional usada para avaliar o espalhamento da luz em moléculas. O espalhamento Raman ocorre quando moléculas dentro de uma amostra são excitadas por uma fonte de luz incidente. Movimentos vibracionais dentro das moléculas conduzem à perda de fração da energia, sendo espalhada em comprimentos de onda diferentes. A diferença do comprimento de onda entre a luz espalhada e a incidente corresponde às vibrações moleculares e leva a bandas de deslocamentos de frequência característicos no espectro Raman. Essas frequências são obtidas em unidades de comprimento de onda correspondentes à energia vibracional ( $\text{cm}^{-1}$ ). Os deslocamentos de frequência servem como uma fonte importante de contraste na avaliação da composição de tecidos, tais como o tecido ósseo (MORRIS; MANDAIR, 2011).

Pode-se utilizar um aparato que forneça radiação monocromática para a excitação do material (como o raio laser, por exemplo), um espectrômetro que faça a dispersão da luz e um detector que converta este sinal luminoso em elétrico para estudar os movimentos vibracionais das moléculas dos diferentes materiais, permitindo a sua identificação. Portanto, por meio desta técnica, é possível determinar as substâncias presentes tanto no tecido normal como em processos patológicos (SILVEIRA JR., 2001).

O espectro Raman traz consigo informações dos modos vibracionais das ligações químicas dos diversos grupos moleculares. Como as bandas de vibração molecular são únicas e específicas, estreitas e sensíveis à variação da estrutura molecular, diferenças que dependem da molécula analisada podem ser facilmente identificadas, fornecendo informação da composição bioquímica específica (ARAÚJO, 2009).

A espectroscopia Raman é uma valiosa técnica analítica, capaz de mensurar a composição química de amostras de sistemas biológicos, como biofluidos, células e tecidos. Além disso, tem sido considerada como uma impressão digital molecular de diferentes substratos, fornecendo informações quantitativas quanto à sua composição química. Assim, o potencial da espectroscopia Raman é derivado da sua habilidade de detectar mudanças ou alterações bioquímicas a nível molecular e, em virtude



dessas características, tem sido utilizada para diagnóstico, prognóstico ou como ferramenta para avaliação de novas terapias (KONG et al., 2015).

O uso de espectroscopia vibracional na investigação biológica oferece várias vantagens, tendo em vista que essa técnica fornece informações sobre a estrutura e a composição do material estudado a nível microestrutural. Além disso, os dados espectroscópicos são obtidos de uma forma não invasiva e permite a análise com uma preparação mínima das amostras, permitindo a análise de amostras frescas, as quais podem estar totalmente hidratadas. Estudos demonstram que os novos equipamentos Raman são capazes de investigar a maioria dos tecidos biológicos, especialmente o ósseo, na faixa visível sem efeito de fluorescência e, por isso, têm sido amplamente utilizados para mapear as proporções de componentes minerais e orgânicos desse tecido (KOZIELSKI et al., 2011).

Pesquisas apontam que parâmetros físico-químicos obtidos das amostras ósseas investigadas por meio da espectroscopia Raman proporcionam um mapeamento confiável de informações relativas à qualidade óssea em um nível molecular, devido à sua capacidade de avaliar eficazmente a presença de componentes orgânicos (cadeias laterais de CH e amida) e minerais (fosfato e carbonato) da matriz extracelular do osso. Os espectros Raman em uma janela de  $800\text{ cm}^{-1}$  a cerca de  $1800\text{ cm}^{-1}$  incluem as faixas de fosfato e carbonato mais características que representam os componentes minerais da matriz óssea. A banda de fosfato mais proeminente é detectada em aproximadamente  $960\text{ cm}^{-1}$ ; e a do carbonato, a  $1070\text{ cm}^{-1}$  (ARAÚJO, 2009; SOUZA et al., 2012; VIDOTTO et al., 2017).

Maia Filho et al. (2014) demonstraram que o aumento da área do pico de Raman a aproximadamente  $960\text{ cm}^{-1}$  (fosfato) é um parâmetro que está relacionado à otimização da neoformação óssea pois representa maior incorporação de conteúdo mineral. Os autores afirmaram também que o período de 30 dias é indicado para análise da composição da matriz inorgânica óssea por espectroscopia Raman por ser um período suficiente para a incorporação de cristais de hidroxiapatita na matriz óssea em modelo animal.

### **3.2 Colágeno como Biomaterial para Enxertia Óssea**

A reparação de defeitos ósseos causados por trauma, infecção, tumores ou doenças genéticas é um desafio clínico que normalmente requer o uso de materiais

de enxerto ósseo. O osso autólogo ou autoenxerto ainda é considerado o "padrão-ouro" clínico e o método mais eficaz para promover a regeneração óssea. Enxertos ósseos osteogênicos têm a capacidade intrínseca de estimular a cicatrização óssea pela presença de células, sobretudo mesenquimais indiferenciadas ou osteoprogenitoras. Todavia, a necessidade de procedimento cirúrgico adicional, fornecimento ósseo limitado e risco de infecção trans e pós-cirúrgica são as desvantagens mais importantes do autoenxerto (BLOKHUIS; ARTS, 2011; GARCÍA-GARETA et al., 2015).

Como alternativa ao uso de autoenxerto, pesquisadores da área da bioengenharia tecidual, mediante os avanços técnico-científicos observados nas últimas décadas, vem estudando biomateriais para atuar como substitutos ou indutores de formação de tecido ósseo (ALMEIDA et al., 2010).

Excluindo o autoenxerto, todos os outros materiais de enxertos são chamados de biomateriais e são definidos como quaisquer substâncias ou arranjos de substâncias (exceto fármacos), de origem sintética ou natural, que são usadas em qualquer período, para repor, reparar ou aumentar qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Esses materiais são metálicos, cerâmicos, poliméricos (sintético ou natural), compósitos, etc. (SANTOS et al., 2005).

A aplicação de biomateriais constituídos de polímeros sintéticos ou naturais vem sendo amplamente investigada por possibilitar a neoformação óssea por meio do processo de osteocondução, o qual caracteriza-se pela capacidade de conduzir ou direcionar a neoformação óssea sobre e entre a estrutura do material de preenchimento (CIANI et al., 2006).

Diversos materiais são utilizados como osteocondutores, com vantagens e desvantagens. Polímeros naturais, como o colágeno, foram extensamente descritos como biomaterial utilizado para engenharia tecidual, devido à sua biocompatibilidade, bioatividade, biodegradabilidade e baixa antigenicidade. Adicionalmente, a presença de sequências de aminoácidos arginina-glicina-aspartato é responsável pelo reconhecimento e adesão celular. Porém, em contrapartida, arcabouços de colágeno puro não apresentam boas propriedades mecânica e podem se degradar muito rapidamente, o que promove insucesso da osteocondução (GARCÍA-GARETA; COATHUP; BLUNN, 2015; MOREIRA et al., 2004; ROCHA et al., 2002).

Em estudo realizado por Ciani et al. (2006), foi avaliado o uso de biomaterial de origem bovina na regeneração de defeitos ósseos segmentares em coelhos. Realizou-

se falha segmentar bilateral de um centímetro de comprimento na diáfise do rádio, com inclusão do perióstio. No membro direito, o defeito foi delimitado por membrana de pericárdio liofilizada, contendo em seu interior uma mistura de proteínas morfogenéticas ósseas adsorvidas a hidroxiapatita, colágeno liofilizado e osso inorgânico. No membro esquerdo, o defeito não recebeu tratamento. Após eutanásia dos animais aos 60 dias e 150 dias de pós-cirúrgico, os resultados radiográficos e histológicos demonstraram que a regeneração óssea foi inibida nos defeitos segmentares tratados com o biomaterial.

Um dos fatores essenciais para determinar o sucesso ou fracasso das reparações ósseas nas quais são enxertados biomateriais osteoindutores é a utilização de material carreador. Este deve aumentar a exposição dos tecidos do hospedeiro à substância indutora e assegurar uma distribuição uniforme, sem permitir que o material implantado ultrapasse os limites do defeito ósseo. Além disso, não deve provocar interferência na regeneração óssea e ainda potencializar a atividade osteogênica. O carreador deve ser absorvido na medida em que ocorre a neoformação óssea. Ademais, deve ser formulado para permitir tamanhos e formas adequados para o seu uso (RENGACHARY, 2002; SANTOS et al., 2005; PRETEL, 2005).

Sais inorgânicos, polímeros sintéticos e naturais (hidroxiapatita, sulfato de cálcio, cerâmicas, glicerol, alginatos, ácido hialurônico e colágeno) podem ser utilizados como carreadores. Dentre estes, o colágeno é o carreador mais utilizado atualmente devido a sua fácil aquisição, pois pode ser obtido de osso, tendões ou ligamentos. Além disso, tem propriedades de um carreador ideal, pois não induz resposta imune e nem reação inflamatória (OAKES, LEE; LIEBERMAN, 2003; RENGACHARY, 2002).

### **3.3 *Bixa Orellana* L.**

#### *3.3.1 Caracterização botânica e composição*

Conhecida popularmente por urucum, a *Bixa orellana* L. (família Bixaceae) é uma planta nativa brasileira (CAPELA et al., 2016). É uma árvore com copa baixa e estendida, geralmente inferior a 6 metros de altura. Seus frutos são cápsulas ovóides, achatadas, com 2 ou 3 carpelos, cobertos de espinhos flexíveis, de cor vermelha,

esverdeada ou parda (Figura 2). Contem, em média, 54 sementes, as quais apresentam 3 a 4 mm de comprimento, que são cobertas por uma substância resinosa de coloração vermelho-alaranjada, que se torna seca, dura e de coloração escura com o amadurecimento (FRANCO et al., 2002; SANTOS et al., 2014).

**Figura 2 – Planta, frutos e sementes do urucuzeiro (*Bixa orellana* L.)**



Fonte: FRANCO et al., 2017

Na composição das suas sementes são encontrados celulose (40-45%), açúcares (3,5 - 5,2%), óleo essencial (3%), óleo fixo (4,5 -5,5%), proteínas (13 -16%), vitaminas (B1, B2, C e A), e minerais (cálcio, ferro, fósforo e zinco). Além de conter lipídeos (ácido linoleico, e, em menor quantidade,  $\alpha$ -linoléico e oléico), aminoácidos (aspartato, glutamato e leucina) e também diversos carotenoides (bixina, norbixina, alfa e beta-carotenos e criptoxantina) (SANTOS et al., 2014).

O pigmento do urucum é extraído da camada externa das sementes de *Bixa orellana* L. e consiste basicamente de bixina, que representa mais de 80% dos carotenoides totais encontrados nas sementes. Além disso, a bixina corresponde em média a 2,5% do peso das sementes desidratadas e trata-se de um apocarotenoide, originado pela clivagem de carotenos (GARCIA et al., 2012).

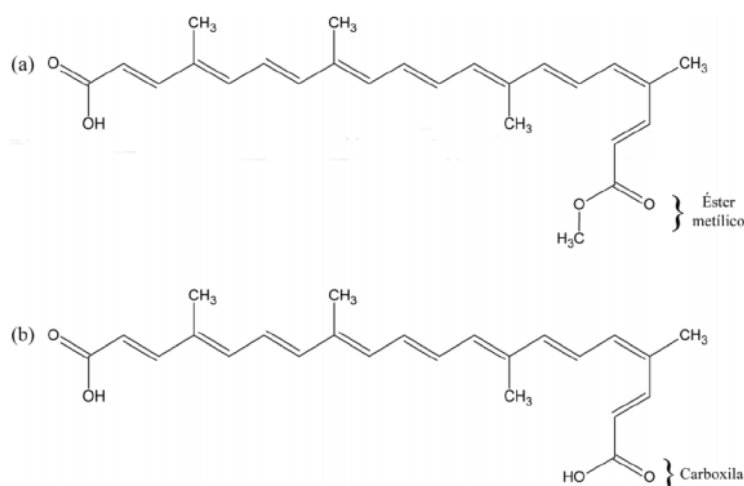
O licopeno é descrito como precursor da bixina, a qual apresenta duas configurações estereoquímicas diferentes: cis e trans-bixina. A cis-bixina é solúvel em solventes orgânicos polares, apresenta uma cor alaranjada, é insolúvel em óleo vegetal e pode ser facilmente convertida em trans-isômeros devido à instabilidade da forma isolada em solução. A trans-bixina é um isômero mais estável, que apresenta uma cor vermelha e é solúvel em óleo vegetal (RIVERA-MADRID et al., 2016).

A bixina possui uma cadeia de 24 carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, perfazendo assim a fórmula molecular  $C_{25}H_{30}O_4$  (SANTOS et al., 2014). Vários outros carotenoides ( $C_{19}$ ,  $C_{22}$ ,  $C_{24}$ ,  $C_{25}$ ,  $C_{30}$ ,  $C_{32}$ ) foram

isolados e identificados das sementes do urucum, porém constituem a parcela minoritárias dos pigmentos (COSTA; CHAVES, 2005).

Os demais carotenoides do urucum podem ser obtidos da bixina por meio da hidrólise alcalina do grupamento éster em uma reação de saponificação. A bixina quando exposta a condições alcalinas perde o grupo metil-éster presente na sua estrutura química, assim produzindo o ácido dicarboxílico livre, denominado norbixina ( $C_{24}H_{28}O_4$ ). Essas diferenças estruturais (Figura 3) conferem à bixina características lipossolúveis, devido à presença do éster metílico na molécula, enquanto a norbixina apresenta maior hidrossolubilidade em razão da presença do grupamento carboxila (GARCIA et al., 2012; PEREZ; SANCHEZ, 2010).

**Figura 3 – Estrutura química da bixina e da norbixina.**



(a) Molécula de bixina. (b) Molécula de norbixina.  
**Fonte:** GARCIA et al. (2012)

### 3.3.2 Extração e método cromatográfico para análise de compostos da *Bixa orellana*

A extração dos carotenoides das sementes de urucum tem sido realizada utilizando óleos vegetais, solventes orgânicos ou soluções alcalinas de NaOH, KOH,  $NaHCO_3$  e  $NH_4OH$ , empregando-se desde técnicas tradicionais, assim como processos mais avançados, como a extração supercrítica e o emprego de micro-ondas (GARCIA et al., 2012).

Em pesquisa realizada por Costa e Chaves (2005), são descritas metodologias para a extração e caracterização da bixina de sementes de *Bixa orellana* L. Os resultados demonstraram que o método de extração de sementes de urucum com solução de hidróxido de sódio conduziu ao melhor rendimento de bixina quando comparado à extração com acetona, à temperatura ambiente ou em Soxhle. A extração com solução salina é mais rápida e de baixo custo, pois não necessita de instrumentação sofisticada.

Estudos relatam que a norbixina, que pode ser obtida por meio da saponificação da bixina, é o principal agente corante nas preparações hidrossolúveis através da extração alcalina com NaOH ou KOH. A bixina ao ser saponificada dá origem à norbixina, e ambas podem estar presentes em uma extração. Estudos demonstram que as várias formas dos pigmentos podem coexistir no meio de acordo com o solvente e com o pH da extração utilizados (NACHTIGALL et al., 2009; YUSÁ-MARCO, 2008).

Silva (2014) relatou em seu estudo a extração de pigmentos de urucum com a utilização de vários solventes. Foram utilizadas soluções aquosas de KOH e NH<sub>4</sub>OH, e soluções de NH<sub>4</sub>OH em etanol a 60% e etanol comercial. Na extração alcalina com KOH, a concentração e a temperatura utilizadas foram fatores que influenciaram na hidrólise da bixina, a qual é um éster monometílico de um ácido dicarboxílico e, em condições alcalinas, o grupo metil pode ser saponificado, produzindo a norbixina que é um ácido dicarboxílico livre. Ou seja, na extração dos pigmentos das sementes de urucum com solução aquosa alcalina em condições controladas tem-se a hidrólise do grupamento éster do principal carotenoide, a bixina, dando origem à norbixina.

Nachtigall et al. (2009) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de KOH (1, 3 e 5%), tempo (1, 2 e 3 horas) e temperatura de extração (30, 50 e 70 °C) na reação de saponificação da bixina. A concentração de bixina diminuiu com o aumento da concentração da base e com o aumento da temperatura de extração. A concentração da base utilizada na extração dos pigmentos de urucum foi o fator que exerceu maior influência na reação de saponificação da bixina.

Para identificação e caracterização de compostos presentes em uma substância, a combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas vem sendo empregada como uma técnica analítica eficaz. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) associa as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as utilidades da

espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade). A CG-EM é aplicável a compostos voláteis e termicamente estáveis nas temperaturas que são utilizadas durante o processo de separação cromatográfica. Quando se faz o acoplamento da cromatografia com a EM obtém-se o chamado cromatograma de massas, que é assim denominado por se tratar de um cromatograma constituído de todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas (CHIRADIA et al., 2008).

A análise química de separação e identificação de constituintes de uma substância a partir da CG-EM é uma das técnicas mais efetivas na caracterização de compostos químicos voláteis, devido à simplicidade, precisão e rapidez. Esta técnica permite a separação dos constituintes, que são introduzidos individualmente em ordem de eluição na câmara de ionização do espectrômetro de massas. O espectro de massas obtido para cada um dos constituintes geralmente indica a massa molecular e o seu padrão de fragmentação, o qual pode ser comparado eletronicamente com aqueles constantes da biblioteca de espectros de massas (THOMAS, 2015).

Para melhorar a resposta do detector e aumentar a eficiência na separação dos picos cromatográficos no cromatógrafo de gases é indicada a derivatização, pois esta modifica os grupos funcionais de moléculas de compostos orgânicos, aumentando a sua volatilidade, diminuindo a polaridade e melhorando a sua estabilidade. As reações mais comumente utilizadas para derivatizar moléculas são as reações de acetilação e de sililação (FRIAS et al, 2014).

A CG-EM vem sendo utilizado para identificação e quantificação dos compostos presentes em extratos de *Bixa orellana* L. COSTA et al. (2013) extraíram o óleo das sementes de *Bixa orellana* com hexano e, a partir dele, isolaram e identificaram o  $\delta$ -tocotrienol e quantificaram seus ácidos graxos empregando a CG-EM. Os resultados demonstraram a presença de  $\delta$ -tocotrienol e, dentre os ácidos graxos, a ocorrência do ácido araquidônico, que até o presente momento não havia sido relatado na espécie em estudo.

Em estudo realizado por CAPELA et al. (2016), os compostos do extrato oleoso de *Bixa orellana* L. foram identificados e quantificados por CG-EM. Inicialmente foram identificados por similaridade os valores dos índices de retenção na coluna e posteriormente confirmados por comparação dos respectivos espectros de massa com aqueles disponíveis na biblioteca *NIST* e *Wiley*. Em seguida, as áreas dos picos

nos cromatogramas foram integradas para a obtenção do sinal iônico total e seus valores utilizados para determinar as proporções relativas respectivas a cada composto. Na caracterização cromatográfica, foram identificados majoritariamente ácidos graxos com conhecida importância terapêutica, como os ácidos linoleico e oleico.

### 3.3.3 Propriedades biológicas da *Bixa orellana* L.

Durante o metabolismo celular, em condições fisiológicas ou patológicas, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas. Essas agem sobre as macromoléculas, tais como açúcares (CHOH)<sub>n</sub>, DNA, proteínas e lipídeos, resultando em dano celular. Há grandes evidências de que o estresse oxidativo tem fundamental importância nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos (VASCONCELOS et al., 2007). O estresse oxidativo induzido pela superprodução de EROS pode dificultar o processo de cicatrização óssea (CHEN et al., 2017).

O organismo humano sofre ação constante de radicais livres gerados em processos inflamatórios. O excesso de radicais livres é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos do meio. Antioxidante é alguma substância que estabiliza uma molécula ou previne significativamente a oxidação da mesma, ainda que apresente menor concentração quando comparada a da molécula oxidável (BARREIROS et al., 2006).

Diversas substâncias antioxidantes foram citadas no combate de radicais livres, tais como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione, coenzima Q (CoQ), ácido úrico, vitamina E ou tocoferol, transferrina, carotenoides, entre outros (VASCONCELOS et al., 2007).

A principal atividade antioxidante dos carotenoides é a desativação do oxigênio singlete. Esta desativação pode se dar de duas formas, pela transferência física da energia de excitação do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> para o carotenoide ou pela reação química do carotenoide com o <sup>1</sup>O<sub>2</sub>. Em condições normais no organismo, 95% da desativação do <sup>1</sup>O<sub>2</sub> é física, restando somente 5% para reagir quimicamente, o que torna os carotenoides antioxidantes mais efetivos (BARREIROS et al, 2006).



As propriedades antioxidantes dos carotenoides também estão associadas com sua capacidade de reagir com radicais livres, principalmente com oxi-radicais (como o superperóxido) e radicais hidropoxila e hidroxila (SANTOS et al., 2014).

Estudos demonstraram que os carotenoides têm efeito na cascata de sinalização intracelular, influenciando assim a expressão gênica e a tradução de proteínas. E que são capazes de interagir com a via do fator nuclear e, assim, inibir a produção de citocinas inflamatórias, tais como a interleucina-8 ou de prostaglandina E2. Ou seja, os carotenoides apresentam capacidade de modular o estresse oxidativo e o processo inflamatório (KAULMANN; BOHN, 2014).

O licopeno e o  $\beta$ -caroteno são mais regeneradores que preventivos, combatendo com mais eficiência os radicais livres formados no interior da membrana celular (BARREIROS et al., 2006). Um estudo clínico mostrou uma correlação direta entre o licopeno sérico, capacidade antioxidante total e a diminuição do risco de osteoporose entre mulheres pós-menopáusicas. Os resultados demonstraram uma correlação direta entre o consumo e os níveis séricos de licopeno, o qual apresenta importante propriedade antioxidante na redução do risco de osteoporose (RAO; RAO, 2007).

Outros estudos demonstraram que, além de diminuir o estresse oxidativo, carotenoides como o licopeno e  $\beta$ -caroteno estimulam a diferenciação osteoblástica e inibem a formação de osteoclastos em cultura de células (efeito inibidor na osteoclastogênese) e, por consequência, interferem no metabolismo ósseo. O  $\beta$ -caroteno, uma vez que pode ser metabolizado em retinol, exerce seu efeito nos receptores de ácido retinóico e/ou receptores retinoides. Estes estimulam marcadores osteoblásticos precoces em células mesenquimais pluripotentes (ISHIMI et al., 1999; KIM et al., 2003; NISHIDE et al., 2015, PARK et al., 1997).

As sementes de urucum podem ser consideradas uma potencial fonte de antioxidantes naturais por conter carotenoides em sua composição, como o  $\beta$ -caroteno, a bixina, a norbixina, dentre outros (GARCIA et al., 2012). Várias propriedades farmacológicas têm sido relatadas com a utilização de extrato do urucum. Entre as quais, antitumoral, adstringentes, emolientes, antissépticas, antibacterianas, anti-inflamatória e antioxidante (PEREZ; SANCHEZ, 2010; RIVERA-MADRID, 2016).

Estudos *in vitro* atribuíram à norbixina propriedades antioxidantes por diminuir o efeito mutagênico do peróxido de hidrogênio na molécula de DNA (SANTOS et al., 2014).

Vilar et al. (2014), em uma revisão de literatura, apontaram as atividades de *Bixa orellana* e seus potenciais usos, e indicaram a viabilidade da sua utilização para o tratamento de algumas doenças, sempre que uma atividade antioxidante, hipotensora ou hipoglicemiante é necessária. Relatam ainda que a *Bixa orellana* L. tem sido usada por comunidades indígenas do Brasil e de outros países tropicais para diversas aplicações biológicas, o que sinaliza seu uso potencial como ingrediente ativo em produtos farmacêuticos.

Porém, Santos et al. (2014) avaliaram o processo de reparo cicatricial de feridas cutâneas abertas de ratos tratadas com extrato aquoso de urucum contendo 2,5% de norbixina através de análise histomorfométrica. Para tanto, realizaram feridas cutâneas no dorso de 32 ratos Wistar machos. Estas foram tratadas com extrato de urucum ou com solução salina 0,9%. Ao final dos 21 dias de intervenção terapêutica, concluíram que o extrato aquoso de urucum contendo 2,5% de norbixina não é inócuo aos tecidos cutâneos e possui efeitos pró-inflamatórios e pró-angiogênicos durante o processo de reparo tecidual cutâneo em ratos, interferindo no processo de cicatrização.

Por outro lado, Capella et al. (2015) realizaram um estudo para avaliar a ação do extrato oleoso de urucum na cicatrização de feridas cutâneas abertas. Inicialmente, identificaram os principais ácidos graxos do óleo de urucum. Em seguida foi realizado ensaio citotóxico para determinar as concentrações a serem utilizadas no ensaio *in vivo*. No experimento, feridas cutâneas em ratos Wistar foram diariamente tratadas com: extrato de urucum 0,1%, extrato de urucum 0,01%, vaselina e solução fisiológica por até 21 dias. Concluíram com este estudo que o extrato oleoso de urucum acelera o processo cicatricial na fase inicial do processo de cicatrização.

Com objetivo de determinar a atividade antibacteriana *in vitro* de *Bixa orellana* L. contra algumas espécies bacterianas patogênicas e comparar com antibioticoterapia padrão, Alim et al. (2016) observaram que o extrato metanólico de urucum tem ação antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (*B. subtilis* e *S. lutea*) e bactéria Gram-negativas (*S. dysenteriae*).

Gutierrez e Romero (2016) investigaram a atividade antiobesidade da bixina em ratos alimentados com dieta com alto teor de gordura. Concluíram que o efeito

antiobesidade da bixina parece estar associada, pelo menos em parte, com o efeito inibitório de enzimas de digestão: tais como a lipase pancreática,  $\alpha$ -glucosidase, e  $\alpha$ -amilase. Os resultados sugeriram que a bixina também atua como um antioxidante e pode tratar níveis viscerais de obesidade, normalização de glicose, resistência à insulina e gasto de energia. Portanto, o urucum, que tem o carotenoide bixina como composto principal, pode ser um alimento viável para o tratamento da obesidade e diabetes.

Espiritu, Lao e Guerrero (2016) compararam o potencial de cura de extrato bruto, aquoso e etanólico de *Bixa orellana* L. em queimaduras de pele em modelo animal com a sulfadiazina de prata disponível comercialmente. As amostras foram investigadas quanto à contração da ferida, tempo de re-epitelização e outras características histológicas do processo de cicatrização. Os resultados sugeriram que a *Bixa Orellana*, independentemente do procedimento de preparação, foi eficaz no tratamento de queimaduras e é comparável à sulfadiazina de prata.

Estudos avaliando a toxicidade do urucum em modelos animais indicaram não haver efeitos genotóxicos, teratogênicos ou mutagênicos (LIMA et al., 2003).

Subhashree e Panda (2016) investigaram a atividade cicatrizante de compostos de *Bixa orellana* extraídos com etanol, acetato de etilo, metanol e éter em dois tipos diferentes de modelos de feridas em ratos albinos, incisão e excisão. Os resultados do referido estudo sugeriram que a aplicação local e a administração sistêmica de extrato etanólico demonstraram atividade cicatrizante de feridas, pois foi verificado aumento significativo na contração da ferida, aumento na resistência à ruptura e formação de cicatriz. A propriedade cicatrizante tem sido atribuída aos seus efeitos antimicrobianos. A presença de fito-constituintes como flavonoides, terpenoides, saponinas, fenóis, esteroides e taninos, individualmente ou em conjunto, pode apresentar o efeito sinérgico na cura de feridas.

## 4 METODOLOGIA

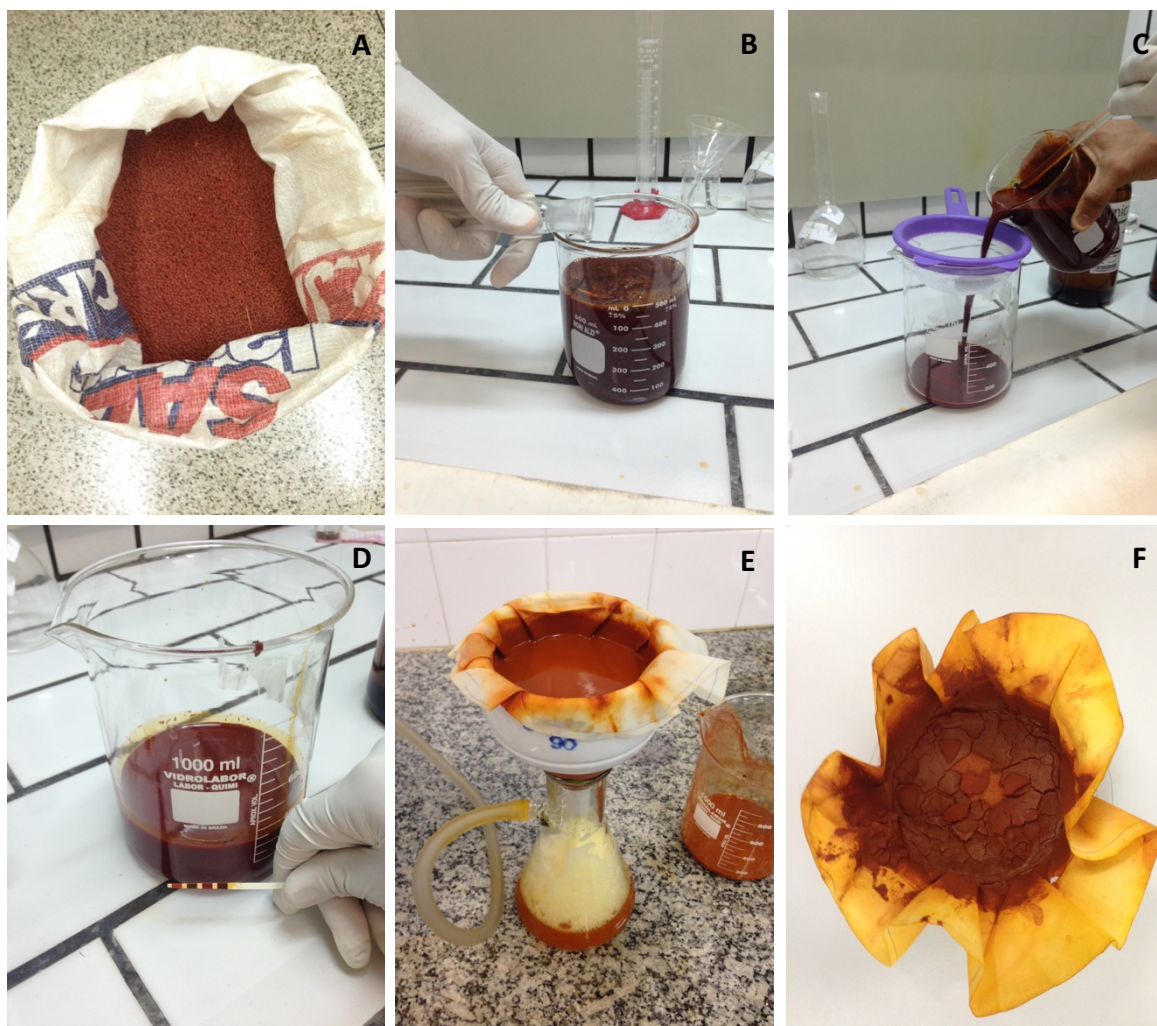
### 4.1 Aspectos Éticos

Este trabalho foi realizado de acordo com a Declaração Universal dos Direitos dos Animais e os princípios éticos da experimentação animal determinados pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONEA), conforme Lei Federal nº 11.794, de 08 de outubro de 2008. O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais – CEUA/FACID em 11 de setembro de 2014, conforme protocolo nº 069/14.

### 4.2 Obtenção de Compostos do Urucum

#### 4.2.1 Extração de carotenoides do urucum

Foram utilizadas sementes de *Bixa orellana* L. (urucum) adquiridas no Mercado Central de Teresina-PI em fevereiro de 2015, produzidas e colhidas na região norte do Estado do Pará (Figura 4/A). Para extrair compostos do urucum, foram pesados 100 g de sementes. Em seguida, foram adicionados 200 mL de éter etílico P.A. agitando-se manualmente a solução por 30 minutos. As sementes foram peneiradas e o líquido descartado. Logo após, foram adicionados 500 ml de hidróxido de potássio (KOH) 4% com agitação manual por cinco minutos (Figura 4/B), e foi realizada nova filtração com peneira (Figura 4/C), descartando as sementes e restando somente a solução, a qual foi levada para uma chapa de aquecimento com controle de temperatura a 70 °C por uma hora. Em seguida, foi realizada a padronização do pH com ácido clorídrico concentrado por meio da análise com tiras PH-Fix, até atingir escala 5 (Figura 4/D). E então, a solução foi levada para a filtração à vácuo (Figura 4/E). O filtrado conseguinte foi levado à secagem a seco em estufa a 40 °C por 12h, obtendo-se o extrato seco contendo compostos extraídos de sementes da *Bixa orellana* L. (Figura 4/F).

**Figura 4 – Processo de extração de carotenoides do urucum**

(A) Sementes do urucum. (B) Adição de KOH 4%. (C) Filtração. (D) Padronização do PH. (E) Filtração à vácuo. (F) Extrato seco.

Fonte: AUTOR

#### 4.2.2 Reação de derivatização por silição e aplicação da CG-EM

Em um balão de fundo redondo de 5 mL foram adicionados cerca de 5 mg da amostra extraída das sementes do urucum, em seguida foi colocado um microagitador magnético no interior do balão o qual foi vedado com um septo de borracha. O sistema foi purgado com nitrogênio gasoso ( $N_2$ ). Foram adicionadas duas gotas de piridina recém destilada para facilitar a dissolução, e a mistura foi agitada até a dissolução completa da amostra e por fim 100  $\mu$ L de BSTFA [bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida] + TMCS 1% (trimetilclorosilano) foram adicionados para realizar a derivatização da amostra.

O sistema foi mantido sob agitação em atmosfera inerte com N<sub>2</sub> e aquecido em banho de areia de 70 a 80° C por uma hora. Para a verificação da reação de silição, foi utilizada uma placa cromatográfica.

A análise dos constituintes foi realizada em cromatógrafo a gás (Thermo GC Ultra) acoplado a espectrômetro de massas sequencial de alta resolução com ionização por impacto de elétrons e analisador triplo quadrupolo (TSQ Quantum XLS). Onde uma alíquota de 2 µL de solução da amostra (5 mg mL<sup>-1</sup>), previamente siliada, foi injetada no cromatógrafo no modo split (10:1).

As condições de análise foram: coluna capilar de 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro e 0,1 µm de fase estacionária dimetilpolisiloxano (100%) para altas temperaturas (modelo COL-ELITE-1HT, PerkinElmer®); o hélio foi o gás de arraste em fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>; programação de análise: temperatura inicial de 100 °C indo até 300°C com uma taxa de 10 °C/min; Temperatura do injetor 290 °C, interface de 300°C. O espectrômetro de massas operou com ionização por impacto eletrônico de 70 eV e faixa de varredura de 50 a 650 Daltons (Da).

A identificação dos constituintes foi realizada por comparação com os espectros de massas com dados da literatura da biblioteca computacional *Wiley229* e *Nist*, a qual armazena informações de compostos previamente identificados, além de proposta das fragmentações.

### **4.3 Ensaio Biológico de Reparação Óssea**

#### *4.3.1 Seleção e manejo dos animais*

Foram utilizados 40 animais *Rattus norvegicus*, machos, peso médio de 300g. Os mesmos foram mantidos em gaiolas de propileno (cinco animais por gaiola) com boas condições de higiene, alimentados com dieta padrão do biotério, ração (*Labina TM*) e água ad libidum.

Os animais foram divididos em quatro grupos de 10 ratos, distribuídos conforme a intervenção terapêutica adotada. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos (n=5) conforme o período de eutanásia, 14 e 30 dias. O ensaio biológico foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Laboratório de Técnicas Histológicas da Devry/Facid.

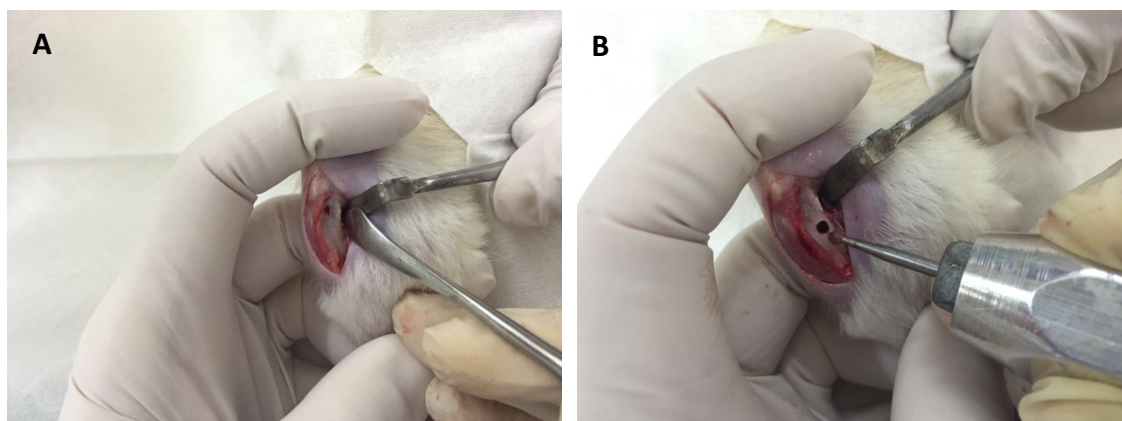
#### 4.3.2 Preparo cirúrgico dos defeitos ósseos

Os animais receberam pré-anestesia com atropina (0,04 mL/100g). Após 15 minutos, foram submetidos à anestesia dissociativa com xilazina (20 mg/mL) e quetamina (50 mg/mL) na proporção de 1:1; com o volume de 0,1mL/100g, dose de 4mg/Kg (MASSONE, 2003).

A preparação cirúrgica do defeito foi realizada na tíbia direita dos ratos, e teve início com a tricotomia da região a ser incisada e antissepsia com clorexidina a 2%. A área operada foi isolada com campos cirúrgicos estéreis e uma incisão linear de 20 mm de extensão, no sentido crânio-caudal, foi realizada com um bisturi nº 15, seguida de divulsão da pele, músculo e periósteo para a exposição da superfície óssea (Figura 5/A).

Em seguida, foi realizado um defeito ósseo monocortical no platô da tíbia direita dos animais, utilizando broca esférica de aço nº 8 montada em um micromotor cirúrgico, sob abundante irrigação com soro fisiológico 0,9%, obtendo-se loja cirúrgica com diâmetro de 2 mm e profundidade até atingir o canal medular (Figura 5/B).

**Figura 5 – Preparo cirúrgico dos defeitos ósseos**



(A) Incisão e exposição do osso. (B) Confecção do defeito ósseo cirúrgico.

Fonte: AUTOR

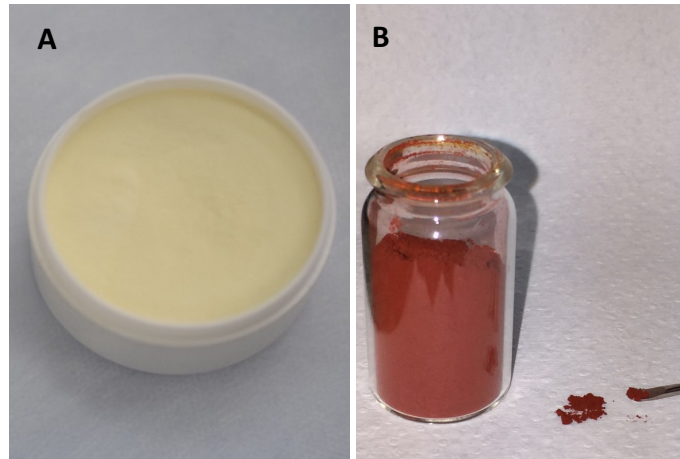
#### 4.3.3 Intervenção terapêutica

Nos animais do grupo 1 (G1), a loja cirúrgica foi preenchida somente por coágulo sanguíneo do próprio animal; nos animais do grupo 2 (G2), com colágeno; nos animais do grupo 3 (G3), com o extrato seco contendo compostos das sementes do urucum; e no grupo 4 (G4), com uma mistura do colágeno e extrato seco contendo



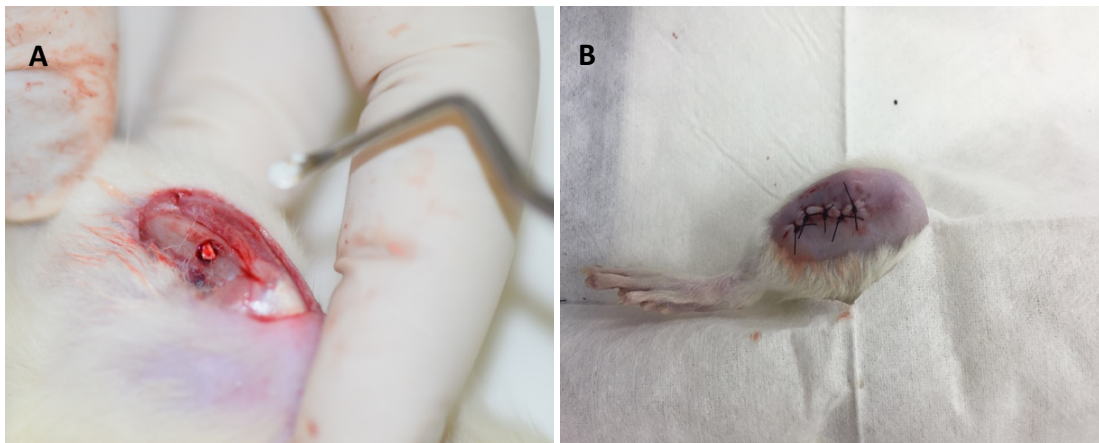
compostos das sementes do urucum na proporção 1:1. Em seguida, foi procedida a sutura por planos com fio de seda 3-0 (Figura 7/B).

**Figura 6 – Biomateriais utilizados para enxertia óssea**



(A) Colágeno. (B) Extrato do urucum  
Fonte: AUTOR

**Figura 7 – Procedimentos de intervenção terapêutica**



(A) Inserção do biomaterial no defeito cirúrgico. (B) Sutura da pele  
Fonte: AUTOR

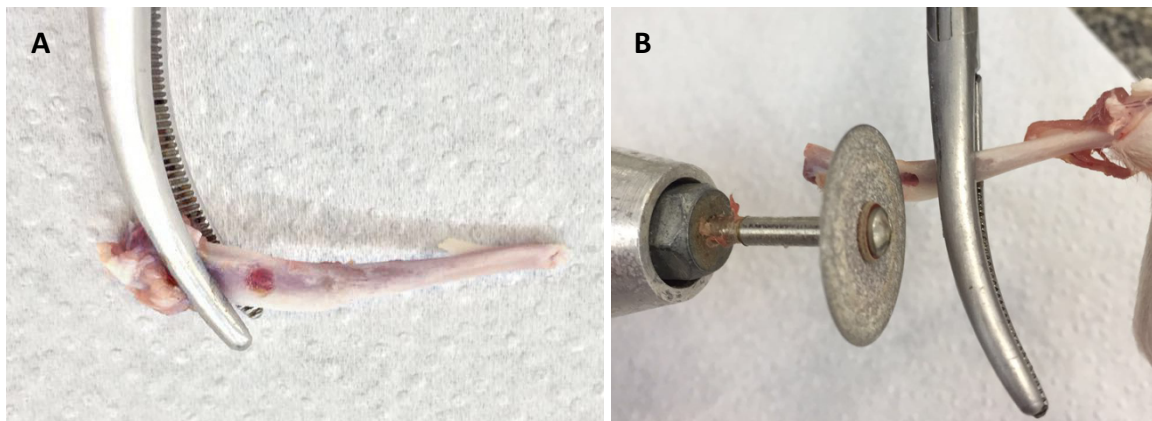
Para terapia antimicrobiana, foi administrado Pentabiótico de amplo-espectro (0,02mL/100g), via intramuscular (MASSONE, 2003).



### 3.3.4 Eutanásia dos animais

Após o período de 14 e 30 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados de acordo com os princípios éticos adequados para a dissecação das amostras que foram submetidas à análise. Os animais foram eutanasiados com sobredosagem de anestésico Tiopental Sódico (0,05 ml/100g), via intraperitoneal (MASSONE, 2003). Logo após a eutanásia dos roedores, foram removidas as amostras ósseas onde foram confeccionados os defeitos (Figura 8/A). Em seguida, os cadáveres foram congelados em freezer para posterior descarte pelo técnico responsável pelo biotério da Instituição.

**Figura 8 – Preparo das amostras das tíbias**



(A) Amostra dissecada. (B) Secção da amostra  
**Fonte:** AUTOR

### 4.3.5 Análise por microscopia óptica

As amostras ósseas foram seccionadas na parte central do defeito cirúrgico, com auxílio de disco de carborundum acoplado a micromotor (Figura 8/B). As porções ósseas foram separadas em recipientes e identificadas de acordo com o grupo e subgrupo ao qual pertenciam.

Uma porção seccionada de cada amostra foi armazenada em formol a 10% por 48h. Depois, desmineralizada em ácido fórmico 20% por 7 dias e encaminhada para o processamento laboratorial de rotina para inclusão em parafina: desidratação em séries crescentes de etanol (70-100%), diafanização em xilol, seguida de inclusão em parafina. Obtidos os blocos de parafina, foram realizados cortes semi-seriados

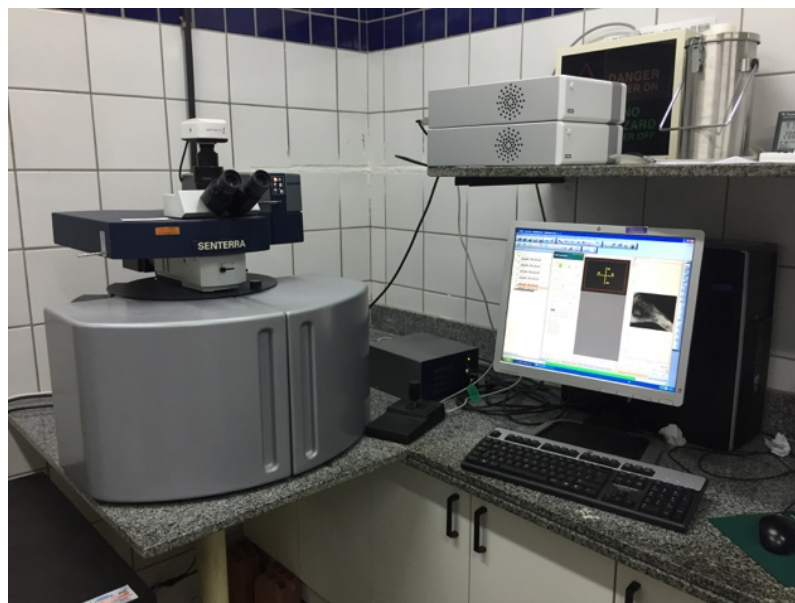
transversais em micrótomo convencional, com espessura de 4  $\mu\text{m}$ , para coloração pela técnica de Hematoxilina-Eosina (H.E.).

Após etapa laboratorial para confecção das lâminas, estas foram numeradas de acordo com o grupo e subgrupo ao qual pertenciam. A análise descritiva histológica foi realizada com auxílio de microscópio óptico, baseada nos critérios: presença de infiltrado inflamatório, presença de necrose, formação de fibrose e neoformação óssea (tecido ósseo imaturo e maduro). As análises foram realizadas por Patologista da Instituição com as lâminas codificadas.

#### *4.3.6 Análise por microscopia confocal Raman*

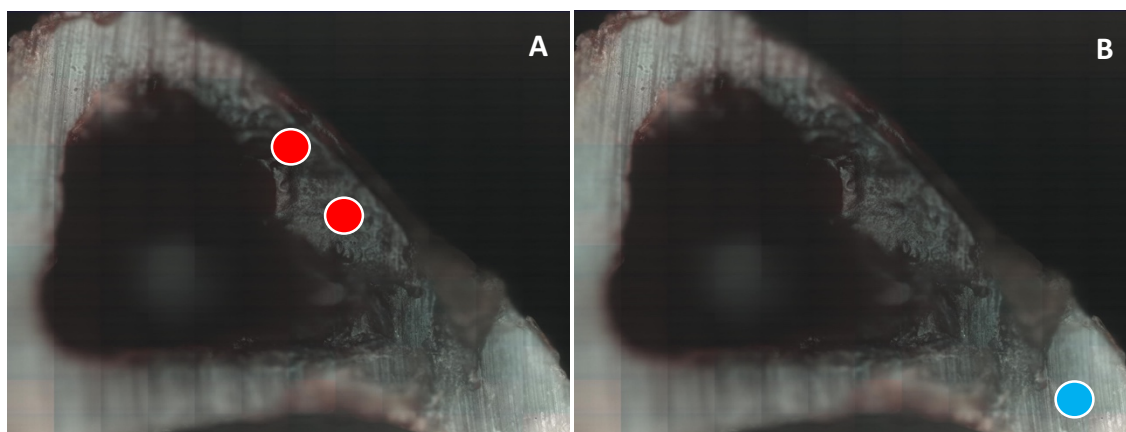
A outra porção de cada amostra óssea, dissecada dos animais eutanasiados com 30 dias (MAIA et al., 2014), foi armazenada em nitrogênio líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), pois a fixação química não é aconselhável para análise por espectroscopia Raman (HANLON et al., 2000; TIMLIN et al., 1999). Para iniciar a obtenção dos espectros Raman, as amostras foram descongeladas em solução fisiológica a 0,9%.

A identificação dos modos vibracionais presentes no osso neoformado foi realizada utilizando-se o microscópio confocal Raman (Figura 9) da marca Bruker®, modelo Senterra, acoplado a um detector (CCD - Charge Coupled Device). Foi utilizada a objetiva 20x para focalização das amostras. Como fonte de excitação para caracterização do espectro Raman, foi utilizado o laser de 785 nm, com potência de saída de 10 mW. Os dados foram obtidos com cinco acumulações de 15 s com ajuste automático de resolução de  $3\text{-}5\text{ cm}^{-1}$ . A região para obtenção dos espectros foi de  $900\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ .

**Figura 9 – Microscópio Confocal Raman**

Fonte: AUTOR

Em cada amostra dos grupos experimentais foram explorados dois pontos situados na região cortical do defeito ósseo (Figura 10/A), com distância de 10  $\mu\text{m}$  entre eles. Porém nos espécimes do grupo controle, além dos dois pontos explorados na área do defeito ósseo, foi explorado um ponto localizado na região de osso hígido da tíbia dos animais (Figura 10/B), pois este foi usado como controle positivo. Ao final, foram obtidos 45 espectros em 20 amostras. Desse número, 40 espectros foram adquiridos na área de defeito ósseo (10 espectros por grupo experimental); e cinco espectros, em osso hígido (grupo controle positivo).

**Figura 10 – Fotomicrografia confocal Raman da tíbia seccionada**

(●) Ponto explorado na região do defeito ósseo (●) Ponto explorado na região de osso hígido

Fonte: AUTOR

Foi utilizado o software PeakFit® para filtragem do sinal Raman e cálculo das áreas internas dos picos 960 cm<sup>-1</sup> (fosfato) e 1070 cm<sup>-1</sup> (carbonato) em cada espectro (Figura 11) para caracterizar alterações de componentes minerais do osso neoformado (MAIA et al., 2014).

A área interna do pico 960 cm<sup>-1</sup> foi denominada “Área 1”. A área do pico 1070 cm<sup>-1</sup> foi denominada “Área 2”.

Os dados obtidos foram importados para o software Microsoft Excel®, para calcular a média das Áreas 1 e 2 em cada amostra. Em seguida, foi calculada a razão entre as Áreas 1 e 2 (descrita na *Equação 1*) de cada amostra, com objetivo de fazer a integração das áreas para suprimir as possíveis variações durante o experimento, como oscilação da potência do laser, diferenças de focalização e geometria das amostras. Pois se houve variação nos parâmetros empregados durante o experimento, esta foi observada proporcionalmente nas áreas internas de ambos os picos.

*Equação 1:*

$$\text{RAZÃO} = \frac{\text{Área 1 (pico 960 cm}^{-1}\text{)}}{\text{Área 2 (pico 1070 cm}^{-1}\text{)}}$$

Para cada grupo foi calculada a média das razões, para posterior comparação intergrupos. Sendo assim, foi possível comparar a mineralização de osso neoformado entre os grupos experimentais e com o padrão de mineralização do osso hígido.

#### 4.3.7 Análise Estatística

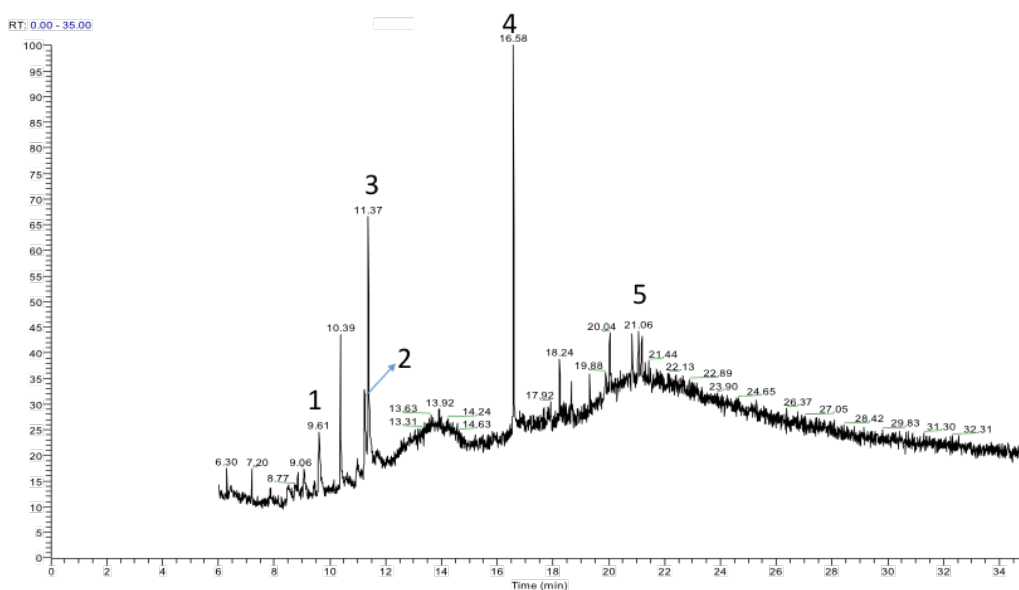
As comparações entre os grupos de tratamentos foram realizadas utilizando o teste ANOVA unidirecional com um nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ) e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer com o auxílio do software *GraphPad Prism 5.0*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectômetro de Massas por Derivatização

Para identificação dos compostos majoritários do extrato das sementes de urucum obtidos após a extração com KOH 4%, foi utilizada a análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas que deu origem ao cromatograma de íons totais do extrato sililado de *Bixa orellana* L. (Figura 11), onde cada pico representa um composto identificado por tempo de retenção na coluna.

**Figura 11 - Cromatograma de íons totais do extrato sililado de *Bixa orellana* por análise em CG-EM**

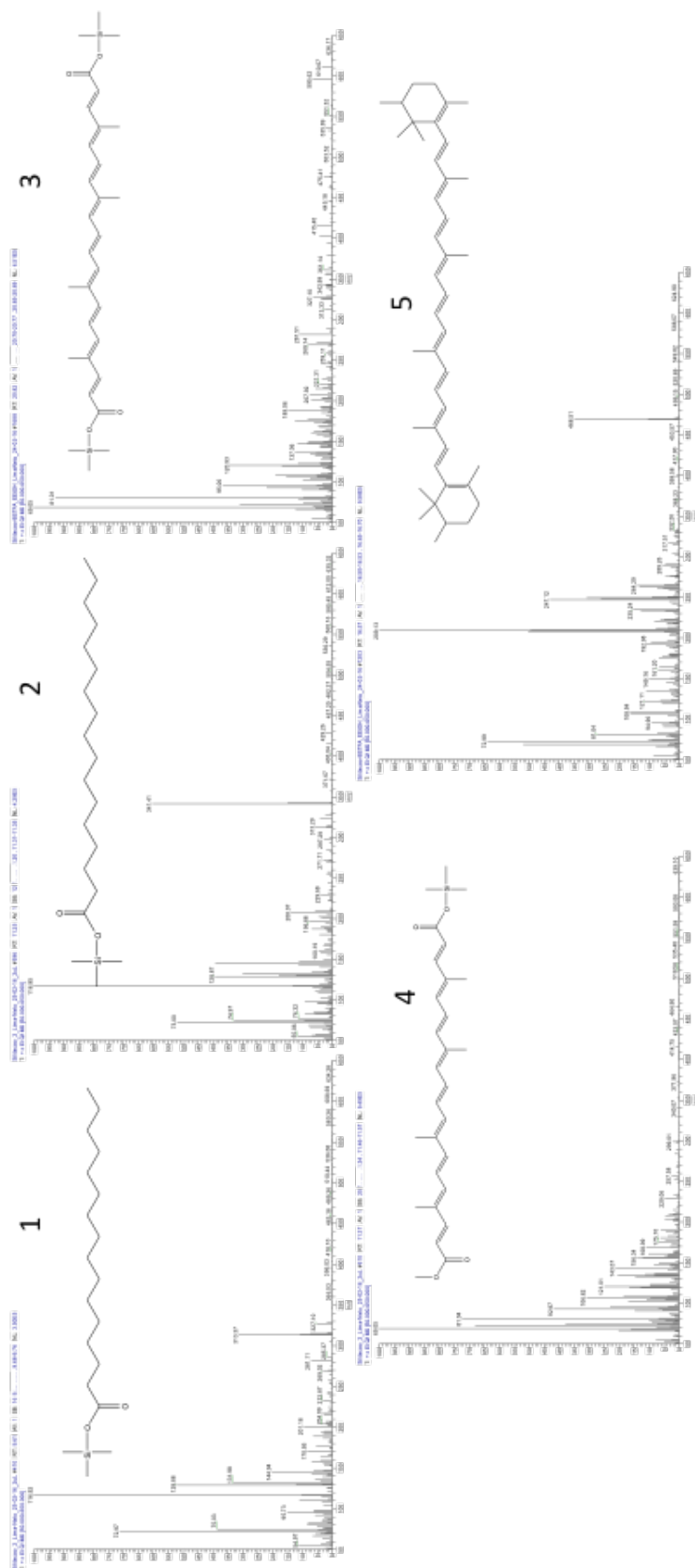


(1) ácido hexadecanóico trimetilsililado. (2) ácido heptadecanóico trimetilsililado. (3) bixina trimetilsililado. (4) norbixina trimetilsililado. (Pico 5) dimetil- $\beta$ -caroteno trimetilsililado.

**Fonte:** AUTOR

Foram observados 11 compostos, dos quais foram identificadas cinco substâncias por comparação dos espectros de massas (Figura 12) com dados da biblioteca computacional Wiley e Nist, as quais armazenam informações de compostos previamente identificados, além de proposta das fragmentações (CAPELLA et al., 2016).

**Figura 12 - Espectros de massas e estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados por CG-EM em extrato de *Bixa orellana* após reação de derivatização**



(1) ácido hexadecanóico trimetilsililado. (2) ácido heptadecanóico trimetilsililado. (3) bixina trimetilsililado. (4) norbixina trimetilsililado. (5) dimetil-β-caroteno trimetilsililado.

**Fonte:** AUTOR

Na caracterização cromatográfica, foram encontrados os seguintes compostos majoritários: ácido hexadecanóico trimetilsililado (10,32%), ácido heptadecanóico trimetilsililado (11,89%), bixina trimetilsililado (25,82%), norbixina trimetilsililado (26,55%) e dimetil- $\beta$ -caroteno trimetilsililado (4,12%) (Tabela 1). Sendo que, dentre estes, os carotenoides (bixina, norbixina e dimetil- $\beta$ -caroteno) representaram os compostos predominantes (56,59%) no extrato das sementes do urucum.

**Tabela 1 – Constituintes químicos majoritários identificados por CG-EM em extrato de *Bixa orellana* após reação de derivatização**

Pico	Tempo de retenção (minutos)	Substância identificada	Sinais de massas encontrados (m/z)	Abundância relativa (%) das substâncias identificadas
1	9,61	Ácido hexadecanóico - TMS	328 (2); 327 (6); 313 (31); 117 (100)	10,32
2	11,25	Ácido heptadecanóico -TMS	342 (15); 341 (60); 117 (100)	11,89
3	11,37	Bixina - TMS	465 (2); 299 (3); 81 (74); 69 (100)	25,82
4	16,58	Norbixina – 2TMS	524 (1); 468 (32); 249 (42); 209 (100)	26,55
5	20,82	Dimetil- $\beta$ -caroteno	563 (2); 535(2); 207 (34); 69 (100)	4,12
Outros sinais				21,3

Fonte: AUTOR

## 5.2 Análise por Microscopia Óptica

A Figura 13 representa as fotomicrografias dos grupos experimentais após 14 dias pós-operatório. Pode-se observar que, no interior do defeito cirúrgico dos espécimes do G1 (grupo controle), foram observadas espículas ósseas delgadas permeadas por moderado infiltrado inflamatório. Recobrimo a área, havia grande quantidade de fibrina (Figura 13/A).

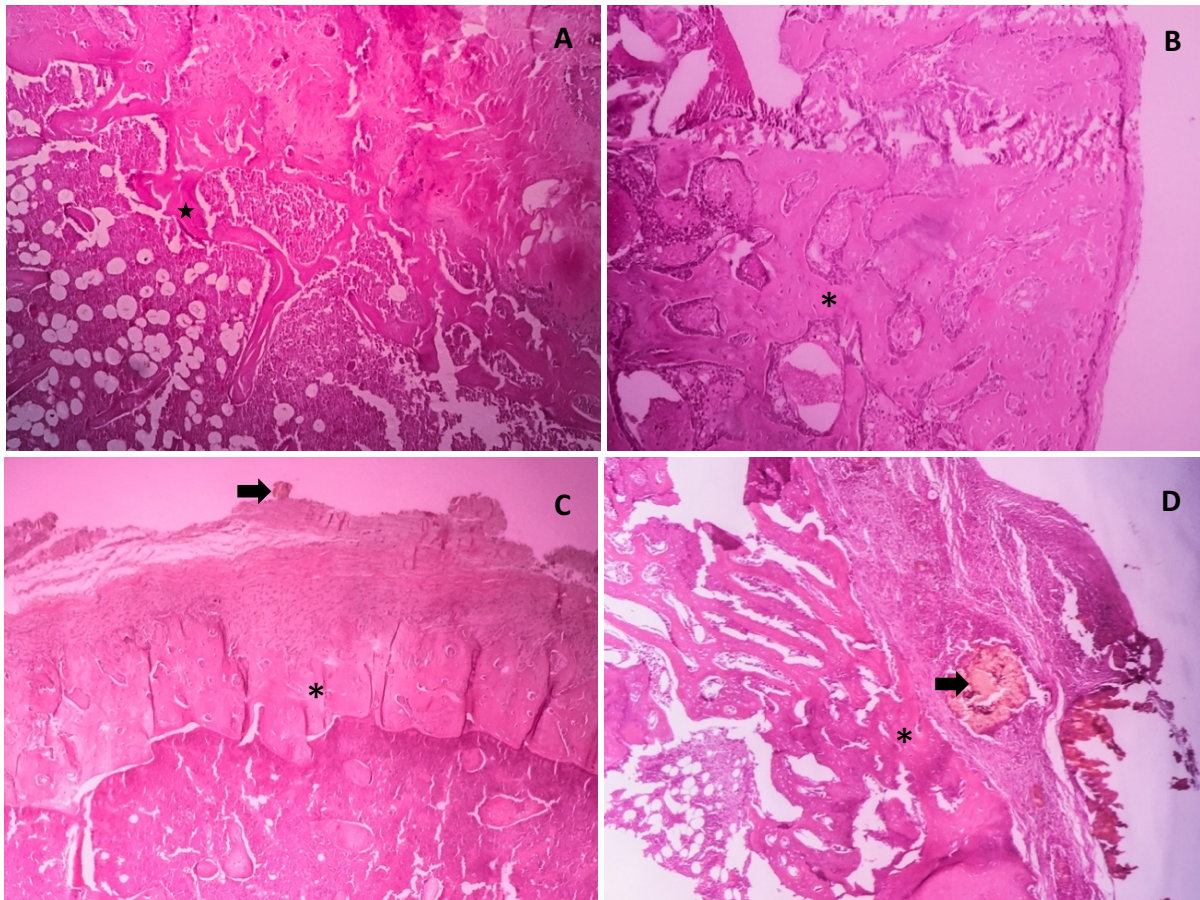
Nas amostras do G2 (colágeno), foram notadas trabéculas ósseas delgadas, intercomunicantes, imaturas e entremeadas por tecido medular, com presença de leve infiltrado inflamatório adjacente. Recobrimo o defeito ósseo, foi verificada uma delgada faixa de tecido conjuntivo denso com proliferação de células indiferenciadas (Figura 13/B).

Nos cortes histológicos do G3 (urucum), foi observado que havia formação de trabeculado ósseo intercomunicante formando uma delgada camada cortical interna no interior do defeito cirúrgico, composta essencialmente por tecido ósseo imaturo. Foram verificados restos de material fibrinoso sobre a área do defeito, permeado por leve infiltrado inflamatório e resquícios de compostos de urucum, os quais apresentavam-se circundados por células osteogênicas (Figura 13/C).



Já nas amostras do G4 (urucum/colágeno), foram verificadas trabéculas ósseas intercomunicantes obliterando o defeito cirúrgico, compostas principalmente por tecido ósseo imaturo. Recobrendo a área do reparo ósseo, observou-se resquícios de compostos de urucum envolvidos por células osteogênicas, com periósteo em organização e leve presença de células inflamatórias (Figura 13/D).

**Figura 13 - Fotomicrografia do reparo ósseo dos grupos experimentais aos 14 dias pós-operatório.**



(A) Grupo controle. (B) Grupo colágeno. (C) Grupo Urucum. (D) Grupo Colágeno/Urucum 1:1. Aumento 100x; H.E. (★ espículas óssea; \* trabéculas ósseas; ➡ resquícios de compostos do urucum)

Fonte: AUTOR



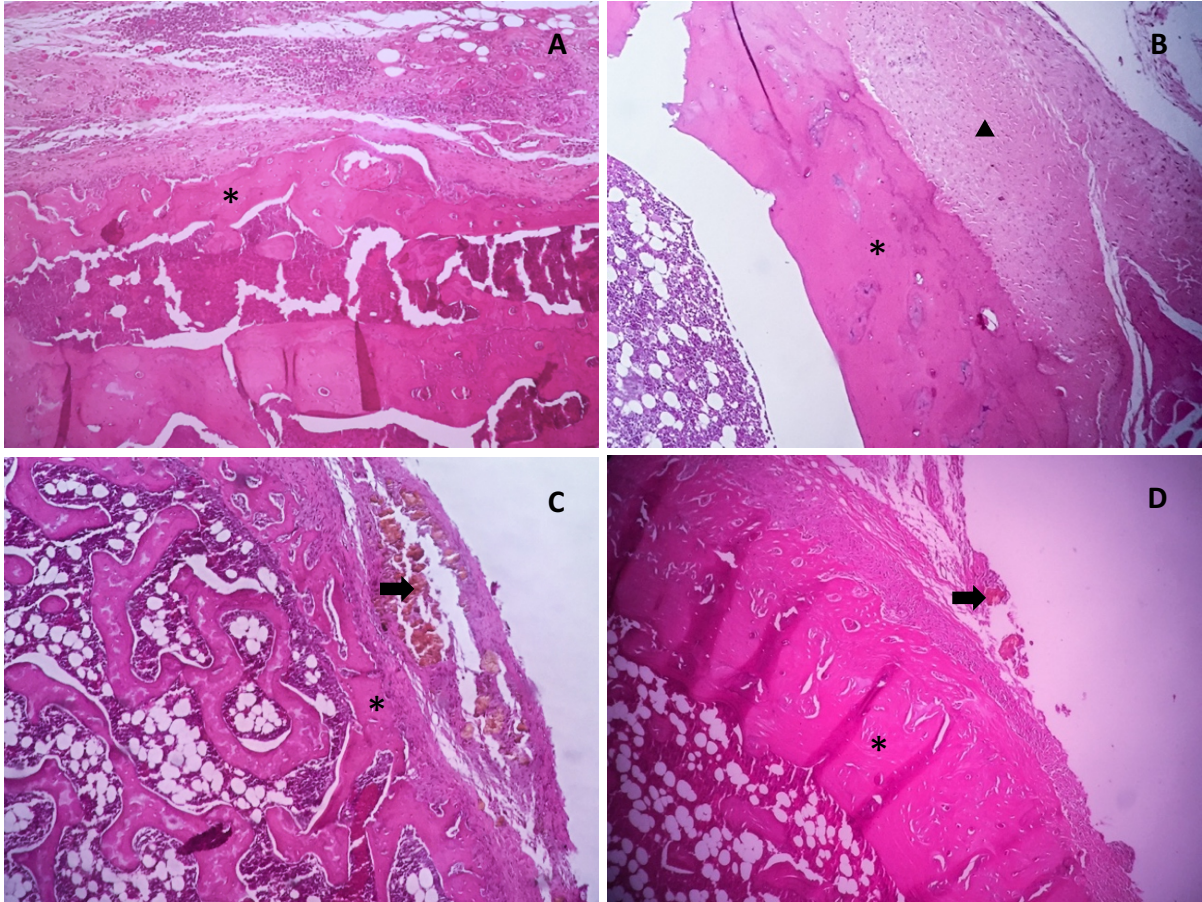
Na Figura 14, a qual representa as fotomicrografias dos grupos experimentais após 30 dias pós-operatório, pode-se verificar que, nos espécimes do G1, o defeito cirúrgico se apresentou fechado corticalmente por trabéculas ósseas delgadas, formadas essencialmente por tecido ósseo imaturo e permeadas por tecido hematopoiético. Sobre a área do defeito, o perióstio em organização e o resto de tecido fibrinoso apresentaram-se com moderado infiltrado inflamatório (Figura 14/A).

Nas amostras do G2, o defeito apresentou-se preenchido por trabeculado ósseo espesso formado por tecido ósseo lamelar permeado por áreas de tecido ósseo imaturo. Sobrejacente a área do reparo ósseo pôde-se observar formação de espessa área de fibrose com diminuta presença de células inflamatórias (Figura 14/B).

Os espécimes do G3 apresentaram o defeito cirúrgico ocluso na margem cortical por trabeculado ósseo intercomunicante, formado por tecido ósseo imaturo e maduro. Além disso, nesta área do reparo ósseo, foram notados resquícios de compostos do urucum circundados por numerosas células osteogênicas e discreto infiltrado inflamatório. Invadindo a região medular da loja cirúrgica, foram observadas numerosas trabéculas ósseas intercomunicantes permeadas por tecido hematopoiético (Figura 14/C).

Já nas amostras do G4, foram verificadas trabéculas ósseas espessas obliterando o defeito cirúrgico, formadas principalmente por tecido ósseo maduro. No perióstio formado, observou-se resquícios de compostos de urucum envolvidos por células osteogênicas e ausência sinais de reação inflamatória (Figura 14/D). Não houve evidências de necrose em nenhum dos grupos experimentais.

**Figura 14 - Fotomicrografia do reparo ósseo dos grupos experimentais aos 30 dias pós-operatório.**



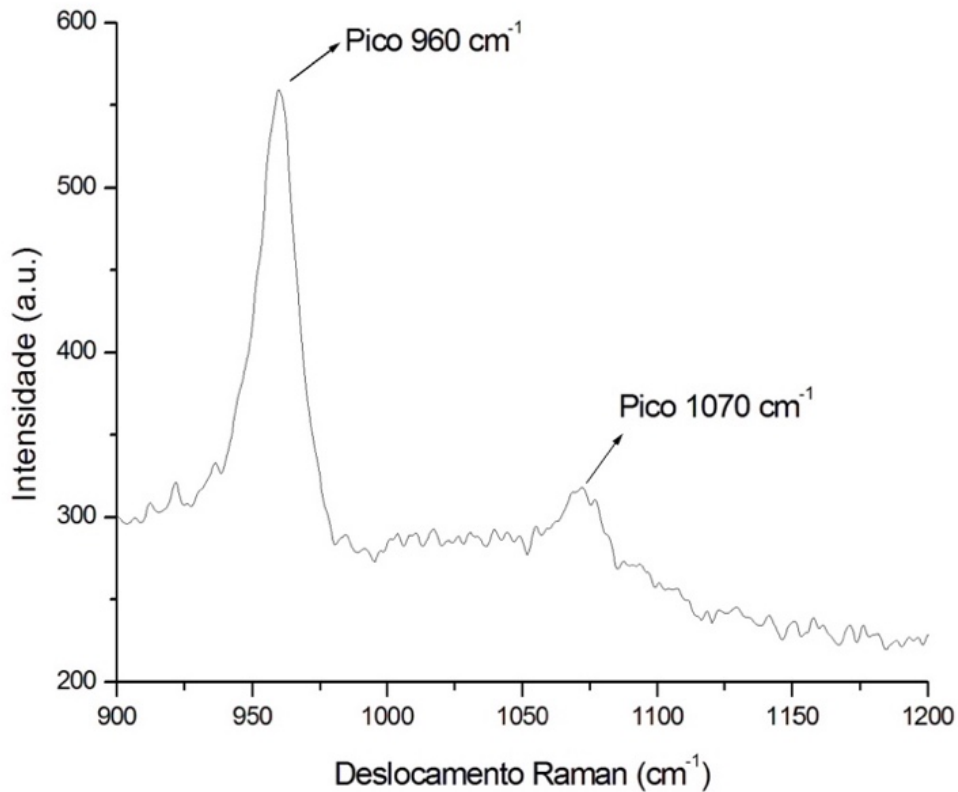
(A) Grupo controle. (B) Grupo colágeno. (C) Grupo Urucum. (D) Grupo Colágeno/Urucum 1:1. Aumento 100x; H.E. (\* trabéculas ósseas; ➡ resquícios de compostos do urucum; ▲ fibrose)

Fonte: AUTOR

### 5.3 Análise por Microscopia Confocal Raman

Os resultados da microscopia confocal Raman demonstraram que, em todas as amostras analisadas, o principal pico, que representa o componente mineral ósseo de fosfato, aparece em  $960\text{ cm}^{-1}$  (Figura 15). Enquanto, o pico do carbonato está na região  $1070\text{ cm}^{-1}$  (KOZIELSKI et al., 2011; MAIA FILHO et al., 2014).

Figura 15- Espectro Raman do osso, mostrando os picos 960  $\text{cm}^{-1}$  e 1070  $\text{cm}^{-1}$



Fonte: AUTOR

Porém, observou-se grande variação das áreas internas destes picos entre amostras (Tabela 2). Por isso, optou-se por calcular a proporção entre as áreas internas dos picos 960  $\text{cm}^{-1}$  e 1070  $\text{cm}^{-1}$  em cada amostra para integração das áreas. Em seguida foi calculada a média das razões de cada grupo para posterior comparação intergrupos.

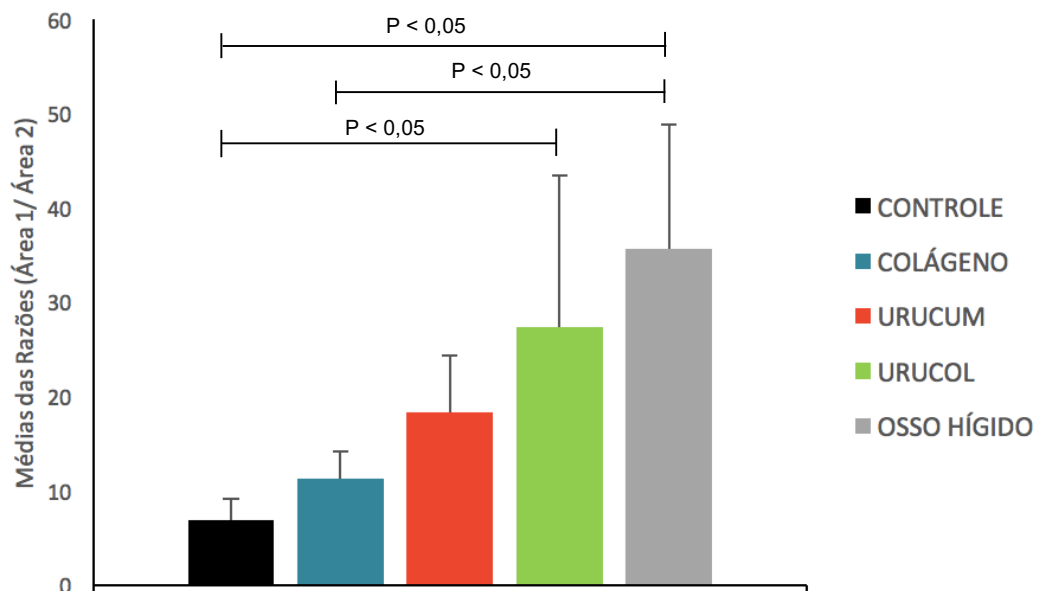
**Tabela 2: Valores das áreas dos picos 960 cm<sup>-1</sup> (Área 1) e 1070 cm<sup>-1</sup> (Área 2) por grupo experimental relacionadas com as concentrações de Hidroxiapatita com 30 dias após a cirurgia**

Amostra	CONTROLE		COLÁGENO		URUCUM		URUCOL		OSSO HÍGIDO		
	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 1	ÁREA 2	ÁREA 1	ÁREA 2	
<b>1</b>	5206,540	1214,435	7610,117	755,623	3254,395	272,998	2412,321	102,354	9724,021	381,394	25,496
<b>2</b>	4845,810	530,925	3381,708	412,739	3567,523	262,579	2186,142	129,063	15591,687	480,676	32,437
<b>3</b>	4271,225	496,580	5119,294	332,508	4969,398	288,584	2397,682	68,795	30618,173	562,183	54,463
<b>4</b>	1957,215	252,800	5282,298	344,715	4090,400	153,435	2333,084	233,183	23141,620	536,468	43,137
<b>5</b>	1446,920	323,760	1888,752	259,438	2142,423	96,992	3460,016	67,707	7727,832	341,019	22,661

Fonte: AUTOR

A análise estatística dos dados (Gráfico 1) mostrou que a média das razões entre as áreas internas dos picos  $960\text{ cm}^{-1}$  e  $1070\text{ cm}^{-1}$  do G4 foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparada à média das razões do G1. Também se observou que a média das razões entre as áreas internas dos picos  $960\text{ cm}^{-1}$  e  $1070\text{ cm}^{-1}$  foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) nas amostras de osso hígido quando comparada à proporção dos G1 e G2. Não foi verificada diferença estatística entre os demais grupos.

**Gráfico 1: Médias  $\pm$  desvios-padrão das razões entre as áreas dos picos  $960\text{ cm}^{-1}$  e  $1070\text{ cm}^{-1}$  por grupo experimental com 30 dias após a cirurgia**



Fonte: AUTOR

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi realizada a extração de compostos das sementes do urucum com KOH 4%. Obteve-se um extrato contendo os carotenoides: bixina, norbixina e dimetil- $\beta$ -caroteno, os quais juntos representam 56,59% dos constituintes majoritários identificados pela CG-EM (Tabela 1). Trabalhos anteriores apontaram que o KOH tem sido utilizado para extração dos pigmentos das sementes de urucum (COSTA; CHAVES, 2005; GARCIA et al., 2012; NACHTIGALL et al., 2009; SILVA et al., 2016; YUSÁ-MARCO et al., 2008).

Os resultados demonstraram que a norbixina foi o composto de maior abundância relativa (26,55%) encontrado no extrato obtido das sementes do urucum, embora a bixina represente 80% dos pigmentos naturalmente encontrados na *Bixa orellana* L. (COSTA; CHAVES, 2005; YUSÁ-MARCO et al., 2008). Outros estudos demonstraram que o derivado desmetilado da bixina é a norbixina ( $C_{24}H_{28}O_4$ ), a qual é encontrada naturalmente em pequena quantidade nas sementes do urucum, porém pode ser obtida por meio da hidrólise alcalina do grupamento éster da bixina em uma reação de saponificação (NACHTIGALL et al., 2009; SANTOS et al., 2014), fato que sugere que ocorreu saponificação da bixina e formação de norbixina no extrato obtido no presente estudo.

Além da extração dos carotenoides bixina e norbixina, também foi obtido e identificado o dimetil- $\beta$ -caroteno, com abundância relativa de 4,32%. Este resultado está em consonância com estudo que apontam que vários outros carotenoides, além da bixina e norbixina, são isolados e identificados, porém constituem a parcela minoritária dos pigmentos extraídos das sementes do urucum (VILAR et al., 2014).

Nos animais do grupo G1, preenchidos por coágulo, foi observada reação inflamatória moderada nos períodos de 14 e 30 dias. Nos grupos G3 e G4, no entanto, observou-se uma redução na densidade do infiltrado inflamatório. É possível que o uso de enxerto de urucum tenha contribuído para este resultado, porque contém majoritariamente em sua composição os carotenoides bixina, norbixina e dimetil- $\beta$ -caroteno (Tabela 1). Estes apresentam atividade antioxidante conhecida (BARREIROS et al., 2006; GOLIN et al., 2013; KAULMANN; BOHN, 2014; PEREZ; SANCHEZ, 2010; RIVERA-MADRID, 2016; RAO; RAO, 2007; SANTOS et al., 2014). A literatura mostrou que as fases iniciais da reparação óssea são caracterizadas pela instalação de processo inflamatório (PEREIRA et al., 2011) e que este gera estresse oxidativo

induzido pela superprodução de radicais livres, que pode dificultar o processo de reparo no tecido (CHEN et al., 2017).

O excesso de radicais livres pode ser combatido pela atividade antioxidante desses carotenoides, os quais apresentam grande capacidade de reagir principalmente com superperóxido, radicais hidroperoxila e hidroxila (BARREIROS et al., 2006; SANTOS et al., 2014).

Os resultados neste estudo evidenciaram que o enxerto de compostos extraídos das sementes de urucum com KOH 4%, associado ou não ao colágeno, é capaz de favorecer os fenômenos iniciais da reparação óssea por diminuir a reação inflamatória nessa fase. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, os quais apontaram a relação entre o uso do urucum e o efeito anti-inflamatório, e sugeriram que esta propriedade ocorra devido à capacidade antioxidante dos carotenoides presentes nele (GUTIERREZ; ROMERO, 2016; PÉREZ; SÁNCHEZ, 2010; RIVERA-MADRID et al., 2016; VILAR et al., 2014).

A extensa cadeia de duplas ligações das moléculas dos carotenoides proporciona variações de distribuição eletrônica que permitem a adição de radicais livres aos carbonos adjacentes às insaturações (GARCIA et al., 2012). Além disso, são capazes de interagir com a via do fator nuclear e, assim, inibir a produção de citocinas inflamatórias, tais como a interleucina-8 ou de prostaglandina E2. Ou seja, os carotenoides apresentam capacidade de modular o estresse oxidativo e o processo inflamatório (KAULMANN; BOHN, 2014).

Microscopicamente, não houve evidência de necrose nas amostras dos quatro grupos, fato que demonstrou que a utilização do extrato do urucum não induziu a morte celular nas amostras dos grupos G3 e G4, embora tenha sido observado resquícios do mesmo aos 14 e 30 dias pós-operatório. Este resultado corrobora estudos anteriores, nos quais foi verificado, em modelos experimentais, que a utilização terapêutica da *Bixa orellana* não produziu efeitos citotóxicos na reparação de pele e mucosa bucal (CAPELLA et al., 2016; ESPIRITU; LAO; GUERRERO, 2016; PÉREZ; SÁNCHEZ, 2010; SANTOS et al., 2014; SUBHASHREE et al., 2016).

Na análise histopatológica, aos 14 dias, pôde-se observar que houve a formação de trabeculado ósseo intercomunicante mais espesso no G3 e G4; contrastando com a formação de delgadas espículas ósseas imaturas evidenciadas na área da loja cirúrgica dos animais do G1 e G2. Sugere-se que este resultado seja decorrente da presença de carotenoides no extrato de urucum enxertado nos defeitos

ósseos dos grupos G3 e G4, pois estes compostos apresentam grande potencial proliferativo de osteoblastos, os quais são diretamente responsáveis pela neoformação de osso conforme mencionado por KIM et al. (2003).

Também pôde-se verificar intensa proliferação de células osteogênicas circunjacentes aos resquícios do urucum nestes grupos (G3 e G4), sugerindo a propriedade de osteoindução desse biomaterial. Estes achados corroboram trabalhos anteriores que demonstraram o efeito estimulador de carotenoides sobre a proliferação celular, bem como seus efeitos inibitórios sobre a osteoclastogênese e, conseqüentemente, sobre diminuição da reabsorção óssea, pois a ação de carotenoides, como o  $\beta$ -caroteno, pode neutralizar os efeitos adversos do estresse oxidativo no osso (RAO; RAO, 2007; NISHIDE et al., 2015).

No presente estudo foi empregada a técnica de espectroscopia Raman para análise da mineralização óssea aos 30 dias pós-operatório. No espectro Raman, o pico observado a  $960\text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração de estiramento simétrica de fosfato primário ( $\text{PO}_4$ ), e este é um marcador utilizado com frequência para análise da mineralização óssea. (ARAÚJO, 2009; MAIA FILHO et al., 2014; SOUZA et al., 2012).

Na intensidade dos picos dos espectros obtidos, e conseqüentemente na área dos mesmos, pode ter havido discrepâncias ocasionadas por variação de focalização das amostras durante o experimento. Por isso, optou-se por calcular a razão da área do pico do fosfato ( $960\text{ cm}^{-1}$ ) em relação a uma segunda variável, a área do pico do carbonato ( $1070\text{ cm}^{-1}$ ), para fazer a integração das áreas (Tabela 2). Pois, se houve discrepâncias, estas afetaram proporcionalmente a área de ambos os picos nos espectros. Esse parâmetro permitiu correlacionar o padrão de mineralização do osso neoformado com o do osso hígido.

Aos 30 dias, pôde-se notar microscopicamente que o reparo do defeito ósseo das amostras nas quais foram enxertados o colágeno (G2), urucum (G3) ou a associação de ambos (G4) apresentaram melhor morfologia de osso neoformado quando comparado ao grupo controle (G1). Apesar da semelhança histopatológica dos reparos ósseos evidenciados nestes três grupos, a análise Raman demonstrou que as amostras do G4 apresentaram média das razões ( $\text{Área 1}/\text{Área 2}$ ) significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando comparado a do G1 (controle negativo). Isto indica que o enxerto de colágeno associado a compostos de sementes de urucum produziu padrão de mineralização melhor, pois se assemelhou à proporção de minerais encontrada no



osso hígido (controle positivo), o qual também apresentou significância estatística quando comparado ao G1.

Nas amostras que se utilizou apenas o colágeno (G2), pôde-se observar que a área do defeito, aos 30 dias, estava recoberta por extensa fibrose. É provável que, embora o colágeno seja um biomaterial com propriedades osteocondutoras, ele sozinho não tenha sido capaz de manter o espaço adequado para o crescimento ósseo, permitindo a invasão de fibroblastos adjacentes ao periósteo, que promoveram a deposição acentuada tecido conjuntivo fibroso (CIANI et al., 2006). Este fato foi salientado pela análise por espectroscopia Raman, na qual os resultados demonstraram que as amostras desse grupo (G2) apresentaram proporção significativamente menor entre as áreas dos picos  $960\text{ cm}^{-1}$  e  $1070\text{ cm}^{-1}$  quando comparada à proporção encontrada no osso hígido, demonstrando inapropriado padrão de mineralização do osso neoformado.

## 7 CONCLUSÃO

Os compostos majoritários extraídos do urucum (*Bixa orellana L.*) com KOH 4% são carotenoides norbixina, bixina e dimetil- $\beta$ -caroteno. O extrato seco obtido das sementes de urucum possui efeitos anti-inflamatório e osteoindutor; e quando associado ao colágeno, promove mineralização da matriz óssea neoformada semelhante à encontrada no osso hígido na análise por espectroscopia Raman. Nas condições apresentadas neste estudo, a reparação óssea em modelo experimental na tíbia de *Rattus norvegicus* é favorecida com a utilização de compostos de urucum (*Bixa orellana L.*) associado ao colágeno.

Este trabalho apresenta grandes contribuições para a produção biotecnológica regional, por ser um estudo pioneiro sobre a utilização de biomateriais de enxertia óssea obtidos a partir de produtos naturais, o urucum e o colágeno, que são de fácil aquisição e baixo custo.

É importante que este estudo venha a causar impacto no meio científico, no intuito de fomentar a realização de novas pesquisas que possam evidenciar a aplicabilidade clínica do enxerto de colágeno associado a composto de urucum, pois configura-se como oportunidade promissora para o desenvolvimento de um protocolo terapêutico odontológico favorável à reparação óssea.

## REFERÊNCIAS

- AGNER, A.R. et al. DNA damage and aberrant crypt foci as putative biomarkers to evaluate the chemopreventive effect of annatto (*Bixa orellana* L.) in rat colon carcinogenesis. **Mutat. Res.** v. 582, p. 146-154, 2005.
- ALIM, S. et al. In vitro antibacterial potential of *Bixa orellana* L. against some pathogenic bacteria and comparative investigation on some standard antibiotics. **J Pharmacogn Phytochem.** v. 5, n. 2, p 178-181, 2016.
- ALMEIDA, J. M. et al. Estudo histomorfométrico do processo de cicatrização óssea em defeitos cirúrgicos de tamanho crítico em calvárias de ratos preenchidos com polímeros de mamona. **Rev. Odontol. Araçatuba (Online).**, v. 31, n.1, p. 22-27, jan./jun. 2010.
- ALVES, R. T. C. et al. Enxertos ósseos autógenos intrabucais em implantodontia: estudo retrospectivo. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Max-Fac.** v. 14, n. 4, p. 9-16, out./dez. 2014.
- ANDIA, D.C.; CERRI, P.S; SPOLIDORIO, L.C. Bone tissue: morphological and histophysiological aspects. **Rev Odontol UNESP.** v. 35, n. 2, p 191-198, 2006.
- ANDRADE, A. D. A. et al. Biologia óssea: uma revisão da literatura. **ImplantNews**, v. 4, n. 06, p. 659-662, 2007.
- ANTEBI, U. et al. Efeitos da radiação ionizante nas proteínas presentes em ossos humanos desmineralizados, liofilizados ou congelados. **Rev Bras Ortop.** v. 51, n. 2, p.224–230, 2016.
- ARAÚJO, K.S. **Efeito da terapia com LED operando em baixa potência sobre a reparação óssea de ratos – Análise por espectroscopia Raman**, 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica – Área de concentração Bioengenharia) Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, São José dos Campos, 2009.
- BARREIROS, A. L. B. S. et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova.** v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BLOKHUIS, T. J.; ARTS, J.J.C. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths. **Int. J. Care Injured.**, v. 42, p. 26-29, 2011.
- BOSSHARDT, D.D.; SCHENK, R.K. **Biologic basis of bone regeneration. In: 20 years of guided bone regeneration.** 2 ed. Chicago: Quintessence Publishing Co, 2009. pp. 15-45.
- CAPELLA, S. O. et al. Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 68, n. 1, p. 104-12, 2016.

CHEN, W. et al. Surface functionalization of titanium implants with chitosan-catechol conjugate for suppression of ROS-induced cells damage and improvement of osteogenesis. **Biomaterials**. v. 114, p. 82-96, 2017.

CHIARADIA, M.C. et al. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Quim. Nova**. v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CIANI, R. B. et al. Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v. 58, n. 1, p. 59-67, 2006.

COSTA, C. K. et al., Identificação de  $\delta$  tocotrienol e de ácidos graxos no óleo fixo de urucum (*Bixa orellana* Linné). **Rev. Bras. Pl. Med**. v. 15, n. 4, p. 508-512, 2013.

COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H. Extração de pigmentos das sementes de *Bixa orellana* L.: uma alternativa para disciplinas experimentais de química orgânica. **Quim. Nova**. v. 28, n. 1, p. 149-152, 2005.

DALMOLIN, F. et al. Biomecânica óssea e ensaios biomecânicos - fundamentos teóricos. **Ciênc. rural**. v. 43, n. 9, p. 1675-1682, 2013.

DINIZ, J. S. et al. Propriedades mecânicas do tecido ósseo: uma revisão bibliográfica. In: 22o CBECiMat - CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS. 2016, Natal. Anais... Natal, 2016.

DINIZ, J. S. et al. Propriedades mecânicas do tecido ósseo: uma revisão bibliográfica. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9.; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 5., 2009, São José dos Campos, SP. Anais... São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2009. 3p.

ESPIRITU, A. A; LAO, S. N. L; GUERRERO, J. J. G. Burn wound healing potential of *Bixa orellana* Linn [Bixaceae] leaf extracts on albino mice. **J. Med. Plants. Stud**. v. 4, n. 1, p. 84-87, 2016.

FRANCO, C. F. O. et al. **Urucuzeiro**: Agronegócio de Corantes Naturais. 1. ed., Emepa, P.B., João Pessoa, 2002, 120 p.

FRANCO, C.F.O et al . Etnobotânica e Taxonomia do Urucuzeiro. 2008. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/UrucumTaxon/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/UrucumTaxon/index.htm)>. Acesso em: 17/5/2017.

FRIAS, C.F. et al. Cromatografia gasosa-espectrometria de massas e derivatização assistida por micro-ondas na identificação de isômeros de glicose: uma prática para o ensino avançado em análise e caracterização de compostos orgânicos. **Quim. Nova**, v. 37, n. 1, p.176-180, 2014.

GARCÍA-GARETA, E. et al. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. **Bone**. v. 81, p. 112- 121, 2015.

GARCIA, C. E. R. et al. Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. **Cienc. Rural**. v. 42, n. 8, p. 1510-1517, 2012.

GENOVESE, W. J. **Laser de Baixa Intensidade: Aplicações terapêuticas em Odontologia**. São Paulo: Editora Santos, 2007.

GUTIERREZ, R. M. P.; ROMERO, R. V. Effects of bixin in high-fat diet-fed-induced fatty liver in C57BL/6J mice. **Asian Pac J Trop Biomed**. v. 6, n. 12, p. 1015–1021, 2016.

HANLON, E. B. et al. Prospects for in vivo Raman spectroscopy. **Phys. med. biol.** v. 45, p. 51-59, 2000.

ISHIMI, Y. et al. Inhibition by Carotenoids and Retinoic Acid of Osteoclast-Like Cell Formation Induced by Bone-Resorbing Agents In Vitro. **J. Clin. Biochem. Nut.** v. 27, p. 113-122, 1999.

JUNQUEIRA, C. L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KATCHBURIAN E.; ARANA V. **Histologia e embriologia oral: Texto-atlas-correlações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KAULMANN A, BOHN T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress - implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutr Res**. v. 34, n. 11, p. 907-929, 2014.

KIM, L. et al. Lycopene effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells. **J Med Food**. v. 6, n. 2, p. 79–86, 2003.

KONG, K. et al. Raman spectroscopy for medical diagnostics — From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 89, p. 121–134, 2015.

KOZIELSKI, M. Determination of composition and structure of spongy bone tissue in human head of femur by Raman spectral mapping. **J Mater Sci Mater Med**, v. 22, n. 7, p. 1653-1661, 2011.

LOPES, C. B.; PINHEIRO, A. L. B.; SATHAIAH, S.; SILVA, N. S.; SALGADO, M. A. C. Infrared Laser Photobiomodulation (830 nm) on Bone Tissue Around Dental Implants: A Raman Spectroscopy and Scanning Electronic Microscopy Study in Rabbits. **Photomed. Laser Surg.**, v.25, n.2, p. 96-101, 2007.

MAIA FILHO et al. Evaluation of inorganic and organic bone components after application of an apatite-coated Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> implants as scaffolds for bone repair. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 57, n. 3, p. 334-339, 2014.

MARÃO, H. F. et al. Regeneração óssea guiada com uso de matriz óssea bovina desmineralizada em defeitos ósseos experimentais em cães. **Rev. Bras. Cir. Craiomaxilofac.** v.14, n. 2, p. 86-90, 2011.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária: Farmacologia e técnicas.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MORATO, G. O. Enxertos ósseos em medicina veterinária. **Investigação.** v. 16, n.1, p.1-5, 2017.

MOREIRA, P.L. et al. In vitro analysis of anionic collagen scaffolds for bone repair. **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater,** v. 71B, p. 229-237, 2004.

MORRIS, M.D; MANDAIR, G.S. Raman Assessment of Bone Quality. **Clin Orthop Relat Res.** v. 469, n. 8, p. 2160–2169, ago. 2011.

MOTA, N. L. et al. Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológica das principais doenças ósseas metabólicas. **Bol. Centro Biol. Reprod.,** Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 27-32, 2008.

NACHTIGALL, A. M et al. Estudo da saponificação em pigmentos de urucum. **Ciênc. Technol. Aliment.** v. 29, n. 4, p. 873-878, out./dez. 2009.

NAGEM FILHO, H. Neoformação do tecido ósseo. **Dent. Sci.** v. 3, n. 9, p. 86-93, 2009.

NISHIDE, Y. et al. Combined Effects of Soy Isoflavones and  $\beta$ -Carotene on Osteoblast Differentiation. **Int J Environ Res Public Health.** v. 28, n. 12, p. 13750-13761, 2015.

NUNES, C. R.; ABREU, A. M. O. W. Influência dos radicais livres e envolvimento do processo inflamatório na aterosclerose. **Vértices,** v. 14, n.3, p. 53-69, set/dez. 2012.

OAKES, D. A.; LEE, C. C.; LIEBERMAN, J. R. An Evaluation of Human Demineralized Bone Matrices in a Rat Femoral Defect Model. **Clin. orthop. relat. res.** v. 413, p. 281-290, 2003.

OLIVEIRA, J. S. **Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum (Bixa orellana L.).** Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005. 189 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2005.

PARK, C.K. et al. Vitamin A and carotenoids stimulate differentiation of mouse osteoblastic cells. **J Nutr Sci Vitaminol.** v. 43, p. 281–296, 1997.

PEREIRA, et al. Regeneração óssea guiada utilizando membrana reabsorvível fixada com etilcianoacrilato. **Rev. Bras. Odontol.,** Rio de Janeiro, v. 68, n. 2, p. 233-7, jul./dez. 2011.

PEREZ, H. C. L. ; SANCHES, G. M. La Bixa orellana L. en el tratamiento de afecciones estomatológicas, un tema aún por estudiar. **Rev. Cuba. Farm.** v. 44, n. 2, p. 231-244, 2010.

PINMENTEL, F. A.; STRINGHETA, P. C. Produção de corantes de urucum em pó, por meio de precipitação ácida, a partir de extratos obtidos em diferentes soluções extratoras. **Rev. Bras. Cor. Nat.** v. 1, p. 53-57, 1999.

PORTINHO, D. et al. Efeitos sobre o tecido ósseo e cartilagem articular provocados pela imobilização e remobilização em ratos Wistar. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 14, n. 5, p. 408-411, out. 2008.

PRETEL, H. **Ação de biomateriais e Laser de intensidade na reparação tecidual óssea. Estudo histológico em ratos.** 2005. 165 f. Dissertação de Mestrado em Ciências Odontológicas- Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, Araraquara-SP, 2005.

RAO A.V., RAO L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacol Res.** v. 55, n. 3, p. 207-16, 2007.

RAO, L.G. Lycopene I - Effect on osteoclasts: Lycopene inhibits basal and parathyroid hormone-stimulated osteoclast formation and mineral resorption mediated by reactive oxygen species in rat bone marrow cultures. **J. Med. Food.** v. 6, n. 2, p. 69–78, 2003.

RENGACHARY, S.S. Bone Morphogenetic Proteins: Basic Concepts. **Neurosurg Focus.** v. 13, p. 1-6, 2002.

RIVERA-MADRID, R. et al. Carotenoid Derivates in Achiote (*Bixa orellana*) Seeds: Synthesis and Health Promoting Properties. **Front Plant Sci.** v. 7, p. 1-7, 2016.

ROCHA, L.B.; GOISSIS, G.; ROSSI, M.A. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing. **Biomaterials.** v. 23, p. 449-456, 2002.

SANTOS, A. A. et al. O Papel da Proteína Morfogenética Óssea na Reparação do Tecido Ósseo. **Acta Ortop. Bras.** v.13, p.194-195, 2005.

SANTOS, G.G., Sônia Maria Oliveira Cavalcanti Marinho e Fúlvio Borges Miguel. Polímeros como biomateriais para o tecido cartilaginoso. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.** v.12, n.3, p.367-373, set./dez. 2013.

SANTOS, J. A. A. et al. Avaliação histomorfométrica do efeito do extrato aquoso de urucum (norbixina) no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Rev. Bras. PI. Med.** v. 16, n. 3, p. 637-643, 2014.

SILVA, E. C. **Eficiência de solventes orgânicos na dissolução do produto natural norbixina.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimento) Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, 2007

SILVEIRA Jr, L. **Correlação entre a técnica de Espectroscopia Raman e a Análise Histológica das placas ateromatosas em artérias coronárias humanas,** 2001. Tese (Doutorado em Ciências - Área de concentração de Fisiopatologia experimental) Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2001.

SOUZA, R. A. et al. Influence of creatine supplementation on bone quality in the ovariectomized rat model: an FT-Raman spectroscopy study. **Lasers Med Sci.** v. 27, n. 2, p. 487-495, 2012.

SUBHASHREE, P.; PANDA, S. K. Evaluation of wound healing potential of crude leave extracts of *bixa orellana* linn. In wistar rats. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.** v. 5, n. 8, p. 1388-1395, 2016.

THOMAS, E. **Caracterização química, atividade citotóxica e genotóxica do óleo essencial de espécies de Aloysia Paláu (Verbenaceae) do Rio Grande do Sul.** 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, 2015.

TIMLIN, J. A. et al. Spatial distribution of phosphate species in mature and newly generated mammalian bone by hyperspectral Raman imaging. **J Biomed. Optics.** v. 4, n.1, p. 28-34, 1999.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova.** v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIDOTTO, V.T. et al. Quantitative evaluation of experimental bone regeneration using indentation tests. **Acta Ortop. Bras.,** v. 25, n. 2, mar./abr. 2017.

VILAR, D. A. et al. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa orellana* L.: A Review. **Scientific World J..** v. 2014, p. 1-11, 2014.

VO, T. N. et al. Acellular mineral deposition within injectable, dual-gelling hydrogels for bone tissue engineering. **J. Biomed. Mater. Res. A.** v. 105, n. 1, p. 110-117, 2017.

YUSÁ-MARCO, D. J. et al. Characterization of colouring compounds in annatto (*Bixa Orellana* L.) used in historic textiles by means of Uv-Vis spectrophotometry and Ft-Ir spectroscopy. **Arché.Publicación del Instituto Universitario de Restauración del Patrimonio de la UPV.** v. 3, p. 153-158, 2008.



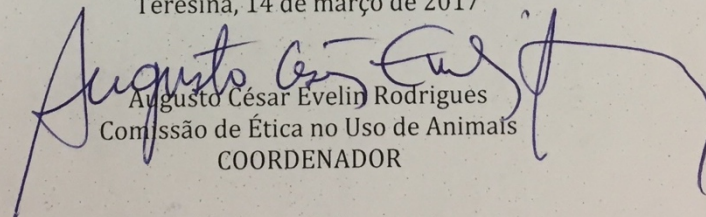
## ANEXOS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “ Avaliação *in vivo* da reparação tecidual com utilização de compostos de urucum (Bixa Orellana L.) associados a colágeno e/ou osso liofilizado em *Rattus norvegicus*”, protocolo nº 069/14, sob a responsabilidade de Antonio Luiz Martins Maia Filho 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA/FACID) da Faculdade Integral Diferencial em reunião na presente data 11/09/2014.

Vigência do Projeto	2015 a 2017
Espécie/ Linhagem	Rattus novergicus
Nº de Animais	64
Peso/ Idade	250/350
Sexo	M
Origem	Biotério FACIME

Teresina, 14 de março de 2017

  
 Augusto César Evelin Rodrigues  
 Comissão de Ética no Uso de Animais  
 COORDENADOR