



RENORBIO - Rede Nordeste de Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Efeito de compostos das sementes do urucum (*Bixa orellana L.*) na
reparação óssea com enxerto ósseo bovino liofilizado em ratos.**

Ísidra Manoela Sousa Portela

**Teresina
2017**

Ísidra Manoela Sousa Portela

**Efeito de compostos das sementes do urucum (*Bixa orellana L.*) na
reparação óssea com enxerto ósseo bovino liofilizado em ratos.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal de Teresina da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rômulo José Vieira

**Teresina
2017**

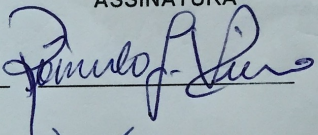
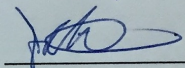
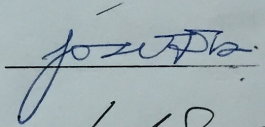
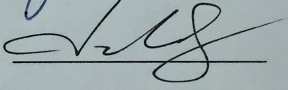
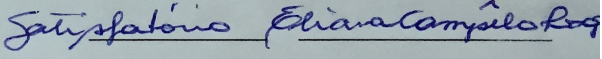
FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNO: ÍSIDRA MANOELA SOUSA PORTELA

TÍTULO DO PROJETO: “Efeito de compostos das sementes do urucum (Bixa orellana L.) na reparação óssea com enxerto ósseo bovino liofilizado em ratos.”

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 (Examinadora)	Satisfatório	
Prof. Dr. José Ferreira Nunes - UECE (Examinador)	Satisfatório	
Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes – UFPI (Examinador)	Satisfatório	
Profa. Dra. Eliana Campêlo Lago - UNINOVAFAPÍ (Examinadora)	Satisfatório	

DATA DA AVALIAÇÃO: 03 de agosto de 2017.

HORÁRIO: 08:00h

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

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à Deus pelo dom da existência, aos meus pais, Marconi (in memoriam) e Graça Sousa pelo amor incondicional; em especial minha mãe por ter sido sempre minha fonte de inspiração, meu exemplo e meu porto seguro. Mãe você conseguiu!!! E principalmente, as duas pessoas mais importantes da minha VIDA, meus filhos Indra e Zilton Filho, sinônimo do mais puro e verdadeiro AMOR.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Rômulo José Vieira pela confiança, disponibilidade e pelas palavras de otimismo e incentivo. Que nosso ciclo de amizade e parceria científica não acabe com o fim do doutorado. Minha eterna gratidão e admiração.

À minha prima/irmã Karinne Sousa de Araújo pela eterna parceria e por compartilhar comigo todas as dificuldades e conquistas do doutorado, assim como os melhores momentos da minha vida.

Aos amigos Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho e Prof. Dr. Vicente Galber Freitas Viana pela amizade e valiosa contribuição nesta pesquisa. E aos verdadeiros “anjos” Prof. Dr. José de Sousa Lima Neto, Prof. Dr. Gustavo Oliveira de Meira Gusmão e Prof. Dr. Cleânio da Luz Lima pela grandiosa orientação nos ensaios químicos e físicos.

Aos alunos Francisco Junio da Rocha Araújo, Samuel Oliveira Costa e Ana Carolina Bezerra Ribeiro pelo auxílio nos procedimentos cirúrgicos deste trabalho.

Aos técnicos de laboratório Tawane Barros e Esmeralda Barros pela disponibilidade e por todo auxílio prestado em nossos experimentos; e a técnica de histologia Ana Cláudia pela excelência e capricho na preparação das lâminas.

Aos professores do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Renorbio por compartilharem seus conhecimentos de maneira brilhante.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Renorbio, em especial a Deusilene, pela constante atenção e aos colegas de pós-graduação pelos momentos de descontração e convivência.

A todos, que direta ou indiretamente participaram...muito obrigada!!!

Então ela bateu na mesa e disse...

“Um dia minha filha vai ser Doutora!!!”

(Maria da Graça Sousa)

RESUMO

A reconstrução tecidual de lesões ósseas causadas por traumas, infecções, neoplasias ou anomalias do desenvolvimento, representa um desafio em procedimentos ortopédicos e odontológicos, direcionando os estudos à investigação de enxertos ósseos que acelerem o processo de reparo. Diante disso, objetivou-se avaliar a reparação óssea utilizando enxerto ósseo associado a compostos das sementes de urucum em tibia de ratos. Para a quantificação/identificação dos compostos do urucum realizou-se a extração alcalina com KOH 4%. Os componentes majoritários das sementes de urucum foram norbixina, bixina e caratenóides. Foram utilizados 40 ratos Wistar divididos em quatro grupos, no grupo controle (G1) os animais tiveram os defeitos ósseos preenchido apenas com coágulo sangüíneo; no grupo (G2) com enxerto ósseo liofilizado; no grupo (G3) com compostos extraídos das sementes do urucum e no grupo (G4) com uma mistura de enxerto ósseo liofilizado/compostos das sementes do urucum na proporção 1:1. Após 14 e 30 dias de tratamento, as peças ósseas foram encaminhadas para análise microscópica e por espectroscopia Raman. Com 14 dias, nos grupos G3 e G4 houve leve infiltrado inflamatório e intensa atividade de células osteogênicas. Com 30 dias, nos grupos G3 e G4, foi observado tecido ósseo maduro e trabéculas ósseas limitando áreas de tecido hematopoiético. Na comparação entre os grupos, houve diferença significativa entre o G4 e G1 ($p < 0,05$) e entre o grupo G4 e G2 ($p < 0,05$) referente ao teor de hidroxiapatita (HA). Conclui-se que os compostos das sementes do urucum aceleraram o processo de reparo ósseo provavelmente devido às suas ações pró-inflamatória e anti-oxidante, enquanto que a mistura de enxerto ósseo liofilizado/compostos do urucum atuaram como material osteocondutor e osteoindutor.

Palavras chaves: Bixa Orellana; reparo ósseo; caratenóides; espectroscopia Raman

ABSTRACT

Tissue reconstruction of bone lesions caused by traumas, infections, neoplasias or developmental anomalies still presents a challenge in orthopedic and dental procedures, directing the studies to the investigation of bone grafts that accelerate the repair process. Therefore, we aimed to evaluate bone repair using bone graft associated with annatto compounds in rat tibia. The quantification/identification of urucum compounds was performed by alkaline extraction with 4% KOH. The major components of annatto seeds were norbixin, bixin and carotenoids. Forty Wistar rats were divided into four groups: in the control group (G1) the animals had the bone defects filled only with blood clot; the group (G2) was filled with lyophilized bone graft; the group (G3) with compounds extracted from annatto, and the group (G4) with a mixture of lyophilized bone graft/urucum compounds in the 1:1 ratio. After 14 and 30 days of treatment, bone pieces were sent for microscopic analysis and Raman spectroscopy. In the 14-day treatment, there were mild inflammatory infiltrate and intense osteogenic cell activity in the G3 and G4 groups. In the 30-day treatment, in the G3 and G4 groups were observed mature bone tissue and trabecular bone limiting areas of hematopoietic tissue. Comparing the groups, there was a significant difference between G4 and G1 ($p < 0,05$) and between G4 and G2 groups ($p < 0.05$). In conclusion, the compounds of annatto seeds accelerated bone healing process probably due to its pro-inflammatory and anti-oxidant actions, while the lyophilized bone graft/annatto compounds mixture also acted as osteoconductive and osteoinductive material.

Keywords: *Bixa orellana*; bone regeneration; carotenoids; Raman spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1- Esquema das células do tecido ósseo.....	17
Figura 2: Planta (A), Floração (B), Frutos (C) e Sementes (D) da <i>Bixa Orellana</i> L.....	25
Figura 3: Estrutura química dos pigmentos do urucum: bixina e norbixina.....	27
Figura 4: Obtenção do extrato seco do urucum: (A) sementes de urucum, (B) adição de KOH 4% as sementes, (C) separação das sementes (D) determinação do pH, (E) filtração à vacuo da solução e (F) extrato seco.....	36
Figura 5: (A) Incisão e exposição do osso na tíbia e (B) Confecção dos defeitos ósseos cirúrgicos com broca esférica nº 8.....	39
Figura 6: (A) Defeitos ósseos preenchidos com osso liofilizado, (B) com extrato seco contendo compostos do urucum, (C) com a mistura de enxerto ósseo liofilizado e extrato seco contendo compostos do urucum na proporção 1:1 e (D) Sutura.....	40
Figura 7: (A) Tíbia contendo o defeito ósseo e (B) corte transversal do defeito com disco diamantado.....	41
Figura 8: Espectrômetro Raman (Senterra, Bruker) usado no estudo.....	43
Figura 9: (A) Fotomicrografia Confocal Raman (50X) da tíbia com dois pontos (azul e vermelho) no interior do defeito e um na cortical óssea normal (amarelo) representando os locais dos espectros selecionados do grupo G1 e (B) nos grupos G2, G3 e G4.....	43
Figura 10 – Cromatograma de íons totais do extrato sililado de <i>Bixa orellana</i> por análise em Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas CG-EM.....	45

Figura 11 – Espectros de massas e estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados por CG-EM em extrato de <i>Bixa orellana</i> após reação de derivatização.....	46
Figura 12– Fotomicrografia do reparo ósseo – 14 dias dos grupos G1 (A), G2 (B), G3 (C) e G4 (D). Aumento 100X; H.E.....	48
Figura 13 – Fotomicrografia do reparo ósseo – 30 dias dos grupos G1 (A), G2 (B), G3 (C) e G4 (D). Aumento 100X; H.E.....	49
Figura 14: Espectro Raman dos picos $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ (fosfato) e $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ (carbonato).....	50
Gráfico 1 – Médias \pm desvio-padrão das razões entre as áreas dos picos Raman de 960 cm^{-1} e 1070 cm^{-1} por grupo experimental com 30 dias após cirurgia.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constituintes químicos majoritários identificados por CG-EM em extrato de *Bixa orellana* após reação de derivatização por sililação.....45

Tabela 2 – Valores das médias das áreas dos picos 960 cm^{-1} e 1070 cm^{-1} e da razão por grupo experimental com 30 dias após cirurgia.....51

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- BSTFA**- bis trismetilsilil trifluoroacetamida
- CC/EM**- Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectômetro de Massas
- CCD**- Charge Coupled Device
- CEUA**- Comissão de Ética de Pesquisa em Uso Animal
- CLAE**- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CONEA**- Conselho Nacional de Experimentação Animal
- Da**- Daltons
- eV**- elétrons-volt
- FAO**- Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
- H.E.**- Hematoxilina-Eosina
- HA**- Hidroxiapatita
- IGF**- Fator de crescimento semelhante à insulina
- KOH**- Hidróxido de Potássio
- M- CSF**- Macrophage Colony Stimulating Factor
- mRNA**- Ácido Ribonucléico mensageiro
- N₂**- Nitrogênio Gasoso
- NaHCO³**- Bicarbonato de Sódio
- NaOH**- Hidróxido de Sódio
- NH⁴OH**- Hidróxido de Amônio
- NO**- Óxido Nítrico
- PO₄⁻³**- Fosfato
- PTH**- Paratormônio
- RANK**- Receptor do fator de transcrição NF-kB
- RANKL**- Ligante de Receptor do fator de transcrição NF-kB
- RGD**- Arginina-Glicina- Ácido Aspéptico
- TGF- β**- Fator de Crescimento Transformador Beta
- TMCS**- trimetilclorosilano
- TNF**- Fator de Necrose Tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3. REVISÃO DE BIBLIOGRAFIA.....	15
3.1 Morfologia do Tecido Ósseo.....	15
3.2 Reparação Óssea.....	19
3.3 Espectroscopia Raman no Tecido Ósseo.....	22
3.4 Carotenóides no reparo ósseo.....	23
3.5 <i>Bixa Orellana L.</i>	24
3.5.1 Aspectos Botânicos do urucum (<i>Bixa Orellana L.</i>).....	25
3.5.2 Componentes das sementes do urucum.....	26
3.5.3 Métodos de extração e identificação dos compostos do urucum.....	27
3.5.4 Usos e ações farmacológicas.....	34
METODOLOGIA.....	35
4.1 Extração dos compostos do urucum.....	35
4.2 Reação de derivatização por sililação e aplicação no CG/EM.....	36
4.3 Ensaio Biológico da Reparação Óssea.....	37
4.3.1 Procedimentos Éticos.....	37
4.3.2 Seleção e Manejo dos Animais.....	38
4.3.3 Preparo Cirúrgico dos Defeitos Ósseos.....	38
4.3.4 Intervenção Terapêutica.....	39
4.3.5 Eutanásia e Descarte dos Animais.....	40
4.3.6 Análise por Microscopia Óptica.....	41
4.3.7 Análise por Espectroscopia Raman Confocal.....	42
4.3.8 Análise Estatística.....	44
5. RESULTADOS.....	45
6. DISCUSSÃO.....	53
7. CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS	6

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, na área médica e odontológica, há uma evidente necessidade de novas terapias com a finalidade de propiciar a reparação óssea em virtude da alta incidência de lesões ósseas, devido à elevada frequência e a gravidade dos acidentes de trânsito que ocasionam efeitos negativos sobre as condições de saúde da população. Além disso, defeitos ósseos surgem frequentemente secundários a um trauma, uma infecção, patologias e deformidades ósseas congênitas. As deficiências reconhecidas nos enxertos ósseos autógenos para o tratamento destas condições levaram a um grande campo de investigação dedicado à descoberta de novos substitutos ósseos (YANG *et al.*, 2010; NAUTH; SCHEMITSCH, 2012).

O desenvolvimento biotecnológico trouxe avanços significativos para o uso de biomateriais, substitutos ou enxertos em tratamentos para o reparo ósseo. Embora o enxerto autógeno seja considerado a primeira opção nas técnicas de enxertia ou “padrão-ouro” devido ao seu potencial osteogênico, osteoindutor e osteocondutor, seu uso é limitado por ser uma fonte esgotável, haver uma necessidade de uma cirurgia adicional na área doadora, causar seqüelas no sítio doador do enxerto (dor, alteração de sensibilidade e cicatrizes), além de ter sua qualidade dependente da idade e das condições gerais do indivíduo (DANTASA, T. S. *et al.*, 2011; PEREIRA, *et al.*, 2012). Essas desvantagens contribuem para o desenvolvimento de algum tipo de material natural ou sintético que, quando utilizado, apresente propriedades similares aos enxertos autógenos.

Os biomateriais, substitutos ou enxertos ósseos são materiais desenvolvidos para uso em áreas da saúde com finalidade de substituir a matéria viva (órgãos ou tecidos) cuja função foi perdida, englobando qualquer substância sintética ou natural que podem ser utilizados para este fim. Para que o enxerto execute sua função biológica com sucesso, o mesmo deve ser utilizado em íntimo contato com os tecidos do indivíduo e que apresente características como: biocompatibilidade, previsibilidade, aplicabilidade clínica, ausência de riscos trans-operatórios e seqüelas pós-operatórias mínimas (AMARAL, 2013).

Os compostos das sementes do urucum (*Bixa orellana L.*), uma planta nativa da América Tropical, tem bixina e norbixina como componentes, sendo que esses compostos correspondem, em média, a 2,5% do peso das sementes desidratadas e trata-se de um apocarotenóide, composto originado pela clivagem de carotenos,

sendo essa ruptura mediada por enzimas que atuam em pontos específicos originando dois novos carotenóides (COSTA; CHAVES, 2005). A retirada do grupo metil éster da bixina origina a norbixina. São escassos os relatos na literatura de estudos que avaliem os efeitos e as propriedades biológicas dos compostos do urucum, especialmente no tecido ósseo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

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

2.2 Objetivos Específicos:

- Identificar por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM) os compostos majoritários do urucum;
- Analisar histologicamente a reparação óssea com a utilização de enxerto ósseo liofilizado associado a componentes de urucum;
- Utilizar a Espectroscopia Raman para identificar os picos do fosfato e carbonato;
- Comparar a razão de fosfato/carbonato no defeito ósseo entre os grupos tratados em relação a proporção do osso normal;

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Morfologia do Tecido Ósseo

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado formado por diferentes tipos de células e por uma matriz extracelular calcificada, denominada de matriz óssea. A matriz óssea é constituída por 25% de material orgânico e 75% de material inorgânico cuja composição é dada basicamente por íons fosfato e cálcio que formam os cristais de hidroxiapatita (HA). A extrema dureza e resistência do tecido ósseo é resultado da interação entre o componente orgânico (colágeno tipo I) e o componente mineral (cristais de hidroxiapatita) da matriz (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

De acordo com Andrade *et al.* (2007), a porção orgânica do osso é composta de proteínas colagenosas e não-colagenosas acrescidas de proteoglicanos. O colágeno tipo I responde por 90% da constituição protéica óssea, servindo como arcabouço estrutural para a fase mineralizada, assim como para a propriedade de resistência óssea. Ainda segundo Andrade *et al.* (2007), as proteínas não-colagenosas possuem a função de promover a mineralização óssea, regulando a adesão e atividade celular durante os fenômenos de formação e reabsorção óssea. Entre as proteínas não colagenosas presentes na matriz óssea, é possível citar: osteocalcina, osteonectinas, osteopontinas, sialoproteína óssea, osteoprotegerina e proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's).

Destas proteínas, a osteonectina é responsável pela ligação das fibras colágenas ao mineral e pela nucleação inicial para a deposição mineral. A osteocalcina é uma proteína não colagenosa responsável pela ligação do cálcio a hidroxiapatita, controlando assim o crescimento do cristal de hidroxiapatita. Já a osteopontina contém uma seqüência de aminoácidos RGD (Arg-Gly-Asp) específica para um receptor integrina responsável pela adesão dos osteoblastos e osteoclastos na matriz, sendo também atuante no recrutamento de osteoclastos (ROSS; PAWLINA, 2009).

As sialoproteínas ósseas são encontrada restritamente na matriz óssea mineralizada, porém não estão presente na matriz osteóide (matriz óssea não calcificada) e têm a função de adesão via seqüência RGD e participam do início da mineralização (ROSKAMP; VAZ; LIMA, 2006).

As BMP's são proteínas multifuncionais do crescimento que pertencem à superfamília do fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e estão envolvidas na regulação, proliferação, sobrevivência, diferenciação e apoptose das células osteogênicas, sendo sua maior habilidade na indução óssea em locais heterotópicos e ortotópicos. O sinal provocado pelas BMP's é traduzido por meio de receptores quinase da serine/threonine, tipo I e II (GRANJEIRO *et al.*, 2005).

De acordo com Andia, Cerrib e Spolidorocas (2006), as células encontradas no tecido ósseo são as células osteoprogenitoras ou osteogênicas, os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. As células osteoprogenitoras são originadas da diferenciação das células mesenquimais que permanecem como células de repouso ou de reserva, e que podem ser estimuladas para se diferenciarem em osteoblastos. Estão localizadas na camada mais interna do periósteo e endósteo.

As células osteoprogenitoras se diferenciam em osteoblastos que produzem a matriz óssea, secretando colágeno do tipo I e a substância fundamental, que constituem o osteóide e situam-se em aposição ao osso em formação. Os osteoblastos também participam da mineralização da matriz, por meio da secreção de pequenas vesículas ricas em fosfatase alcalina que cliva o pirofosfato e aumenta o fosfato local para a cristalização. Além disso, durante o crescimento ósseo e durante a remodelagem do osso adulto, os osteoblastos secretam vesículas ricas em cálcio para o osteóide em calcificação (MOTA *et al.*, 2008).

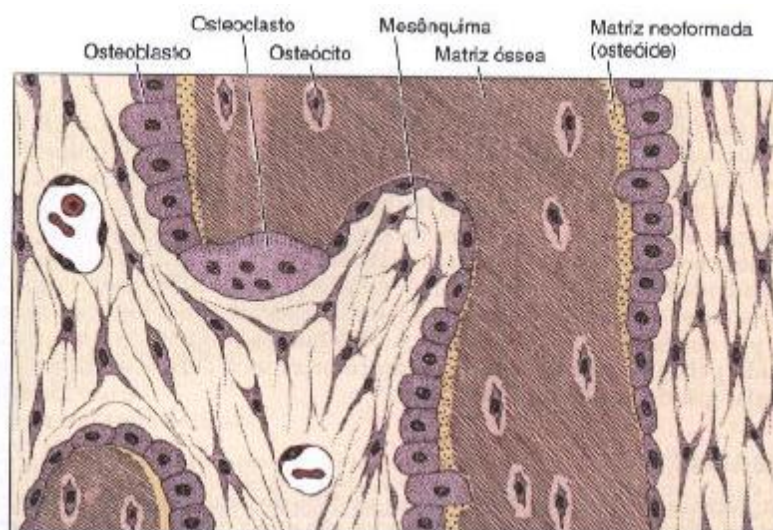
Os osteoblastos possuem na sua superfície receptores para diversos fatores, como o paratormônio (PTH), glicocorticóides, hormônio do crescimento (GH), além de interleucinas (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF-alfa), prostaglandinas e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF), e ainda receptores para hormônios sexuais (ROSS; PAWLINA, 2008). Dispõem-se nas superfícies ósseas, lado a lado, em arranjo epitelial, e quando estão em intensa atividade sintética, são cubóides e, em estado pouco ativo, tornam-se achatados (Figura 1). Uma vez aprisionado pela matriz recém-sintetizada, os osteoblastos passa a ser chamado de osteócitos (GARTNER; HIATT, 2008).

Os osteócitos são células achatadas em forma de amêndoas com vários prolongamentos citoplasmáticos, localizados em cavidades ou lacunas no interior da matriz óssea. O corpo celular dos osteócitos fica nas lacunas enquanto os prolongamentos são envolvidos por canalículos que se dirigem para outras lacunas, facilitando assim a difusão de nutrientes entre osteócitos. Portanto, apresentam um

papel fundamental na manutenção da integridade da matriz óssea por meio da captação iônica (KIERSZENBAUM, 2012).

Para Narducci, Bareggi e Nicolin (2011), os osteoclastos são as células mais especializadas do corpo humano, tendo como principal função a reabsorção óssea, por meio de um conjunto de enzimas, moléculas de adesão e mecanismos de reconhecimento, que permitem um equilíbrio entre a reabsorção e a deposição de tecido ósseo. Morfologicamente são células gigantes, multinucleadas, móveis e derivadas dos monócitos do sangue fazendo parte, portanto, do sistema monocítico. Estão localizadas na periferia da matriz óssea ao lado dos osteoblastos em locais de depressão da matriz denominada lacunas de Howship (Figura 1).

Figura 1- Esquema das células do tecido ósseo.



Fonte: Junqueira e Carneiro (2013)

Segundo Amadei et al. (2006), a osteoclastogênese é um processo complexo que é regulado por diferentes células, nomeadamente pelos osteoblastos e por células estromais da medula óssea. Os osteoblastos e células estromais estimulam a diferenciação e a proliferação dos osteoclastos por meio do contacto com as células precursoras e da libertação de M-CSF (macrophage colony stimulating factor) e de RANKL, o ligante do receptor RANK (receptor para a ativação do fator de transcrição NF- κ B).

O fator M-CSF é essencial nas primeiras etapas da osteoclastogênese, aumentando a capacidade de sobrevivência dos precursores osteoclásticos. O

RANKL pertence a superfamília dos ligantes de fator de necrose tumoral (TNF). A sua ligação ao receptor RANK na superfície das células precursoras induz, juntamente com o M-CSF, a expressão de genes que tipificam a linhagem osteoclástica: TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato), CATK (catepsina K), CTR (receptor da calcitonina), CA2 (anidrase carbônica 2), integrinas da classe $\beta 3$, entre outros (ROSKAMP; VAZ; LIMA, 2006).

Os precursores osteoclásticos, por estímulos quimiotáticos, migram pela corrente sanguínea e quando atravessam a parede dos vasos sanguíneos por diapedese chegam até ao osso. A ligação do RANK com seu ligante RANKL favorece a diferenciação dos osteoclastos pelo contato célula-célula que aderem à superfície óssea através de integrinas, tornando-se osteoclastos maduros multinucleados. A diferenciação e a proliferação dos osteoclastos são inibidas pela osteoprotegerina (OPG), sintetizada pelas células da linhagem osteoblástica, por meio da sua ligação ao RANKL, impedindo a sua ação. A quantidade de OPG aumenta com o grau de diferenciação osteoclástica permitindo assim manter um equilíbrio entre a reabsorção e a síntese de novo osso (TERA et al., 2014).

Segundo Falonia e Cerri (2007) entre os fatores sistêmicos associados à homeostase do tecido ósseo, o paratormônio (PTH), a calcitonina, a 1,25-dihidroxi-vitamina D3 [1,25(OH)₂ D3], os glicocorticóides e o estrogênio são importantes para a regulação do metabolismo ósseo. Com exceção da calcitonina, os demais fatores sistêmicos atuam sobre osteoblastos, os quais, por meio da liberação de fatores locais, interferem na formação, na atividade e na sobrevivência dos osteoclastos.

De acordo com seu aspecto morfológico e anatômico, o tecido ósseo pode ser classificado em osso compacto (sem cavidades visíveis) e osso esponjoso (com cavidades intercomunicantes ocupadas pela medula óssea e separadas por trabéculas ósseas). Já histologicamente, o tecido ósseo pode ser classificado em quatro tipos: o tecido ósseo primário ou imaturo, o composto, o secundário, maduro ou Haversiano e o fasciculado (BETTI, 2004).

Para Gusmão e Belangero (2009), o osso trabeculado é o primeiro a ser formado e caracteriza-se por apresentar uma matriz óssea desorganizada sem as estruturas lamelares dos sistemas haversianos. É o tecido que caracteriza a primeira fase da cicatrização óssea, sendo reabsorvido e substituído por osso lamelar.

O termo tecido ósseo composto é usado para descrever o estágio de transição entre o osso primário e o osso secundário. O tecido ósseo secundário é um tecido

maduro que forma-se devagar, e que caracteriza-se por apresentar fibras colágenas organizadas em lamelas ósseas concêntricas, formando os sistemas de Havers, que é a unidade estrutural do osso compacto. Já o tecido ósseo fasciculado é o osso encontrado onde estão inseridos os feixes de fibras de Sharpey na superfície interna da parede óssea do alvéolo dentário (TEN CATE, 2008).

Para Lirani (2004), os ósteons ou sistemas de Havers são estruturas cilíndricas, paralelas à diáfise dos ossos longos, compostas por quatro a vinte lamelas ósseas concêntricas em torno dos canais de Havers. Os canais de Havers se comunicam entre si, com a cavidade medular e com a superfície externa do osso através de canais transversais ou oblíquos denominados de canais de Volkmann.

O processo de formação do tecido ósseo é chamado de ossificação intramembranosa, quando ocorre no interior de uma membrana conjuntiva mesenquimal, ou ossificação endocondral, quando se inicia sobre um molde de cartilagem hialina, que gradualmente é eliminado e substituído por tecido ósseo. A ossificação intramembranosa começa a partir de um centro de ossificação primária onde as células mesenquimais indiferenciadas se diferenciam em osteoblastos e estes sintetizam matriz osteóide. Na ossificação endocondral ocorre hipertrofia dos condrócitos, diminuição da matriz cartilaginosa, mineralização e morte dos condrócitos por apoptose, e em seguida células osteogênicas diferenciam-se em osteoblastos e iniciam a produção de matriz óssea (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

3.2 Reparação Óssea

Segundo Abbas et al. (2016), o tecido ósseo rapara-se por regeneração, ou seja, o osso é capaz de reparar fraturas ou defeitos locais com tecido que apresenta a mesma morfologia e função do tecido ósseo original. A reparação óssea pode seguir dois padrões distintos: reparação direta ou primária, e reparação indireta ou secundária. A reparação primária consiste na formação direta de osso lamelar no defeito ósseo ou na linha de fratura, a partir dos sistemas de Havers da cortical óssea, sem formação de calo ósseo. Ao contrário da consolidação indireta ou secundária, que é a forma mais comum de cicatrização das faturas, e consiste em uma cicatrização óssea endocondral e intramembranosa com formação de um calo intermediário antes da formação do calo ósseo (GERSTENFELD et al., 2006).

É amplamente relatado na literatura a utilização de enxertos, substitutos ósseos

ou biomateriais que auxiliam o processo de reparo de defeitos ósseos. De acordo com Gutierrez *et al.* (2006), os enxertos ósseos podem ser obtidos de diferentes origens: autógeno (do mesmo indivíduo), alógeno (de indivíduos da mesma espécie), xenógenos (de espécies diferentes) ou aloplástico (sintético).

Os biomateriais inorgânicos são compostos alternativos ao uso de enxertos ósseos autógenos por serem produzidos com propriedades potencialmente semelhantes as do tecido receptor e, quando usados em defeitos de ossos longos, constituem-se em obstáculo à invasão do tecido mole vizinho, permitindo crescimento de tecido ósseo diretamente sobre suas trabéculas porosas e acelulares (GUTIERRES *et al.*, 2006).

De acordo com Dinato, Nunes e Smidt (2007), os mecanismos fisiológicos envolvidos no processo de formação óssea podem ocorrer por três maneiras distintas: osteogênese, osteocondução e osteoindução quando da utilização de enxertos ou substituto ósseos. Na osteogênese, o enxerto contém osteoblastos viáveis ou células precursoras osteogênicas que estabelecem novos centros de formação óssea. Na osteoindução, o enxerto induz a transformação de células precursoras (mesenquimais indiferenciadas) do hospedeiro em matriz óssea, produzindo osteoblastos. E na osteocondução, o enxerto atua como um arcabouço para deposição de novo osso pelo tecido ósseo vivo adjacente e a matriz é reabsorvida e substituída por osso neoformado.

Zielak *et al.* (2007) observaram em um modelo animal experimental a resposta clínica e histológica na efetividade de preenchimento e osteopromoção de um osso bovino liofilizado desproteinado, visando às suas aplicações odontológicas. Ao final, constataram que a aplicação do biomaterial demonstrou uma melhor manutenção de volume tecidual bucal, e histologicamente observaram características favoráveis ao reparo e à neoformação óssea, grande vascularização, proliferação celular mais fusiforme e infiltrado inflamatório com presença de células do tipo corpo estranho.

Em seu trabalho, Lima 2013, avaliou histologicamente a integração do enxerto autógeno (AU), do aloenxerto ósseo liofilizado desminarelizado (ALD), do aloenxerto ósseo congelado mineralizado (ACM) e do coágulo sanguíneo (CO) em um modelo de regeneração óssea. Foram usados um animal doador primário de enxerto ósseo e oito animais submetidos a um modelo de regeneração óssea guiada, onde 32 cilindros de titânio foram fixados na calota craniana e preenchidos aleatoriamente com AU, ALD, ACM e CO. Os autores concluíram que os aloenxertos podem ser considerados

soluções adequadas para o crescimento ósseo.

Para Nóia *et al.* (2014) os melhores resultados clínicos ainda são alcançados por meio da utilização do osso autógeno, pois esse é o único material que apresenta as propriedades ideais para uma adequada neoformação óssea (osteocondução, osteoindução e osteogênese), porém esse tipo de enxerto tem uma taxa muito grande de reabsorções.

Takauti *et al.* (2014) avaliaram o processo de reparação óssea induzida por três biomateriais em calota craniana de coelhos. Foram realizadas quatro perfurações padronizadas de 8 mm de diâmetro nos ossos parietais e enxertados dois biomateriais de origem bovina: Bio-Oss® e Endobon® Xenograft Granules e um totalmente aloplástico: Straumann® Bone Ceramic. Uma cavidade permaneceu com coágulo e foi utilizada como controle. Após oito semanas os animais foram eutanasiados e as amostras preparadas para análise morfométrica e qualitativa. Os resultados demonstraram que as cavidades preenchidas com o biomaterial aloplástico apresentaram percentualmente maior quantidade de osso neoformado.

Rodriguez *et al.* (2016) compararam a resposta do tecido ósseo em defeitos ósseos no calvária de coelhos tratados com enxertos ósseos de matriz bovina e humana. Aleatoriamente foram selecionados um lado da calota para ser mantida sem qualquer preenchimento, enquanto que o outro lado foi preenchido com osso liofilizado desmineralizado de origem bovina (grupo I) e osso liofilizado desmineralizado de origem humana (Grupo II), utilizando-o como partículas. As avaliações histológicas foram realizadas em 7 e 15 semanas após os procedimentos cirúrgicos e os autores concluíram que ambos os materiais são úteis na regeneração óssea, neste modelo experimental.

Jayme *et al.* (2016) relataram um tratamento com enxerto ósseo de uma maxila atrofica com necessidade de aumento vertical. Foi utilizada uma combinação de rhBMP-2 do osso bovino particulado (Lumina Bone – Large Grain, Criteria, São Carlos, Brasil), tela de titânio (Ti Mesh-Lock, Intra-Lock, São Paulo, Brasil), plasma rico em fibrina e leucócitos (L-PRF – Intra-Lock, São Paulo, Brasil). A combinação de materiais demonstrou ser eficaz na reconstrução óssea, com ganho de espessura e altura, provendo resultados satisfatórios estéticos e funcionais.

3.3 Espectroscopia Raman no Tecido Ósseo

A Espectroscopia Raman é uma técnica que utiliza uma fonte de luz laser monocromática na qual, ao atingir um objeto, é espalhada por ele em todas as direções, sendo que uma pequena parte dessa radiação é espalhada inelasticamente, isto é, com frequência (ou comprimento de onda) diferente da incidente (DAS; AGRAWAL, 2011). Esse fenômeno foi observado experimentalmente em 1928 por um indiano chamado de Chandrasekhara Venkata Raman, e por esse motivo, foi chamado de efeito Raman (MOVASAGUI; HEHMAN; REHMAN, 2007).

Lopes *et al.* (2007) avaliaram, por meio da espectroscopia Raman, a incorporação de hidroxapatita de cálcio (CHA) no reparo de fraturas tibiais completas em coelhos tratados com osteossíntese de fio (WO), tratados ou não com terapia a laser e associado ou não ao uso de BMPs e/ou Regeneração Óssea Guiada (GBR). Foram criadas fraturas tibiais completas em 12 animais que foram divididos em quatro grupos: WO; WO + BMPs; WO + terapia a laser; e WO + BMPs + terapia a laser. Os autores concluíram que o uso da terapia com laser associada a BMPs e GBR foi eficaz na melhoria da cicatrização óssea nos ossos fraturados como resultado do aumento da deposição de CHA medida por espectroscopia Raman.

Para Moreira *et al.* (2008), quando a luz Raman é espalhada ela pode ser coletada por um espectrômetro, onde sua intensidade é detectada em função da mudança de frequência (deslocamento Raman). Um vez que cada amostra molecular possui seu próprio conjunto vibracional molecular, o espectro Raman de uma amostra em particular consistirá de uma série de picos que fornece a identificação da molécula estudada. Desta forma, Manoharam, Wang e Feld (1996) consideraram o espectro Raman como uma impressão digital das moléculas analisada.

Atualmente, técnicas de espectroscopia Raman têm sido empregadas com sucesso ao avaliar as propriedades do tecido ósseo (SOUZA *et al.*, 2008; ARAÚJO, 2009; MORRIS; MANDAIR, 2011; DOOLEY, 2011; MAIA FILHO *et al.* 2014; MANDAIR; MORRIS, 2015). De acordo com a literatura, o espectro Raman típico do tecido ósseo deve apresentar picos característicos em aproximadamente (\sim) 431, 589, 959, 1006, 1070, 1268, 1453 e 1668 cm^{-1} . O pico na região de $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ é o de maior intensidade e representa a vibração de alongamento simétrico do fosfato (PO_4^{-3}), sendo considerado o principal marcador de matriz inorgânica do osso (CARDEN;

MORRIS, 2000). Segundo Bohic et al. (2000), o pico centrado em $\sim 1070 \text{ cm}^{-1}$ está relacionado com o modo vibracional do carbonato (CO_3^{-2}) e indica a extensão de incorporação desse íon na molécula de hidroxiapatita.

De acordo com Teixeira *et al.* (2014), na espectroscopia Raman Confocal o fonte de luz laser é focada diretamente na amostra por uma objetiva de microscópio. O sinal Raman é retroespelhado e reorientado para uma abertura que funciona como um filtro. Em seguida, esse sinal filtrado é direcionado para o espectrômetro onde é disperso em um detector CCD (*Charge Coupled Device*) que produzirá o espectro.

3.4 Carotenóides no reparo ósseo

Os carotenóides são considerados um grande grupo de pigmentos presentes na natureza, identificados em organismos fotossintetizantes e não fotossintetizantes, sendo responsáveis pelas cores laranja, amarela e vermelha das frutas, hortaliças, plantas superiores, algas, bactérias, fungos e leveduras. Além disso, são utilizados comercialmente como corantes alimentícios e em suplementos nutricionais (UENOJO, MARÓSTICA JUNIOR, PASTORE, 2007).

Segundo Barbosa (2010), os carotenóides têm a estrutura química básica de tetraterpeno de quarenta carbonos, formado por oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica. A característica de maior destaque nestas moléculas é a presença de duplas ligações conjugadas, responsáveis por suas propriedades e funções tão especiais.

Tem sido relatado na literatura que alguns carotenóides atuam na proliferação e diferenciação de células ósseas. A ação do retinol e dos carotenóides nas células ósseas osteogênicas clonais MC3T3-E1, da calvária de rato recém-nascido foi investigada *in vitro* por Park et al. (1997), avaliando o crescimento celular, a atividade da fosfatase alcalina e a expressão do mRNA de osteopontina. Segundo os autores, o beta-caroteno aumentou a atividade da fosfatase alcalina e o retinol aumentou a expressão do mRNA da osteopontina.

O primeiro relato sobre os efeitos do licopeno sobre osteoblastos de origem humana foi efetivado por Kim, Rao e Rao em 2004 em células SaOS-2 de osteossarcoma. Nesse trabalho, os efeitos do licopeno sobre a atividade da enzima fosfatase alcalina na ausência ou presença de dexametasona mostraram-se dependentes do estágio de diferenciação celular, além de efeitos estimuladores

significativos no aumento do número de células.

Yamaguchi (2012) relatou sobre o papel da b-criptoxantina na regulação da homeostase óssea e na prevenção da osteoporose, especialmente os mecanismos celulares e moleculares pelos quais a b-criptoxantina estimula a formação óssea osteoblástica e inibição osteoclástica na reabsorção óssea. Segundo o autor, o B-criptoxantina modula a expressão gênica de várias proteínas que envolvem a formação óssea osteoblástica e a reabsorção óssea osteoclástica.

Em outro estudo, Nishide et al. (2015) investigaram o efeito combinado de isoflavonas de soja e β -caroteno sobre a diferenciação de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 e observaram que uma combinação de isoflavonas e β -caroteno pode ser útil para manter um balanço positivo do turnover ósseo induzindo a diferenciação dos osteoblastos.

Wang *et al.* (2017) buscaram elucidar como o β -caroteno afeta a formação de osteoclastos e a reabsorção óssea expondo os derivados monócitos/macrófagos da medula óssea (BMM) a 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 e 0,6 μ M de β -caroteno. Os autores avaliaram da viabilidade celular, liberação de lactato desidrogenase (LDH), o ligante do receptor RANK (receptor para a ativação do fator de transcrição NF- κ B) e a reabsorção óssea. Neste estudo, o β -caroteno inibiu significativamente a viabilidade dos derivados BMM e promoveu a liberação de LDH em concentrações de 0,4 e 0,6 μ M, diminuindo assim a osteoclastogênese e reabsorção induzida pelo RANKL.

3.5 *Bixa orellana* L.

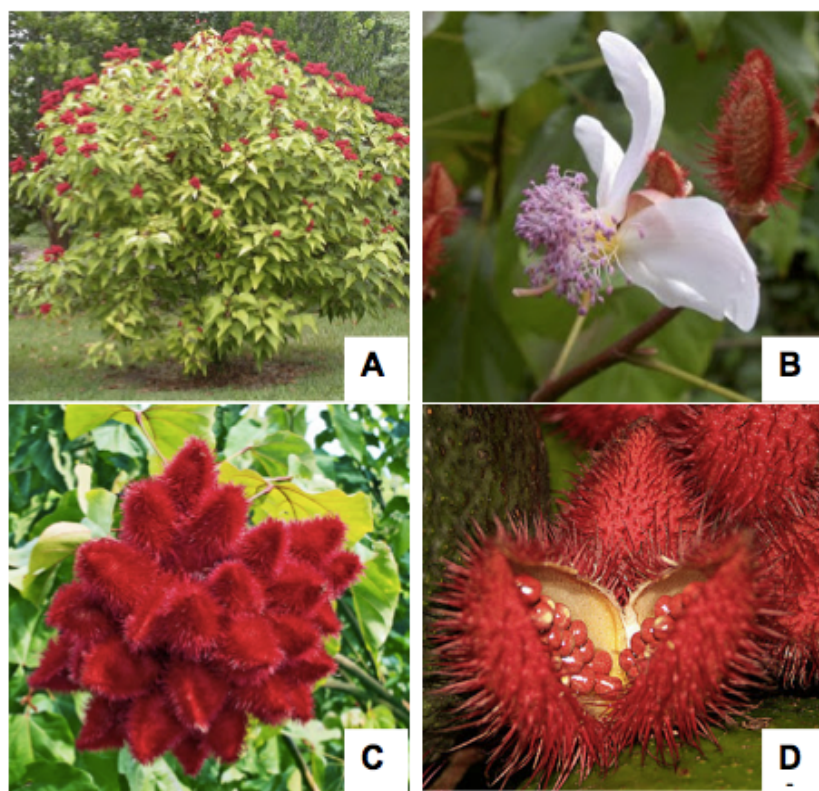
A *Bixa orellana* L. é uma planta nativa brasileira, da região amazônica, conhecida popularmente por urucum, cujo nome foi em homenagem ao botânico Francisco de Orellana, após uma expedição na região na Amazônia Setentrional. O nome popular urucum provém do vocabulário tupi “uru-ku”, que significa vermelho, devido sua utilização como corante pelos índios que untavam-se com seu óleo e sementes para participar de ritos cerimoniais (GIULIANO; ROSATI; BRAMLEY, 2003).

Por conta da sua distribuição em diferentes regiões do mundo, além de urucum e *B. orellana* como é conhecida no Brasil, apresenta outros nomes populares em outros países como: bija e achiote, no Peru, Cuba e Porto Rico; axiotl, no México; urucu, na Bolívia; annatto e annatto tree, na Inglaterra; onotto e onotillo, na Venezuela; roucou ou rocouyer, na França; e orleansbaum, na Alemanha (ALONSO, 2004).

3.5.1 Aspectos Botânicos do urucum (*Bixa orellana* L.)

O urucuzeiro é uma planta pequena ou arbusto que apresenta uma folhagem de três a cinco metros e pode atingir até 6 a 10 metros de altura (Figura 2A). Seu tronco é curto e tem 20 a 30 cm de diâmetro, sendo revestido por uma casca de coloração parda com lenticelas em filas verticais. Possui uma copa bem desenvolvida com folhas pecioladas, alternadas, cordiformes, acuminadas e persistentes de cor verde em ambas as faces e com pecíolo alargado (FRANCO *et al.*, 2008).

Figura 2: Planta (A), Floração (B), Frutos (C) e Sementes (D) da *Bixa orellana* L.



Fonte: <https://belezadacaatinga.blogspot.com.br>

Segundo Revilla (2001), as flores são pequenas, de coloração branco-rósea, com cinco pétalas largas e redondas aparecendo na ponta dos galhos; os estames são numerosos podendo apresentar cor branca ou amarelada (Figura 2B). Os frutos são numerosos podendo apresentar cor branca ou amarelada (Figura 2C). Os frutos com formato de cápsulas espinhosas, ovóide, com dois ou três carpelos, contendo em seu bojo de 30 a 50 sementes com arilo ceroso de cor vermelha ou laranja, reunidos em cachos com até 17 unidades (Figura 2C e D).

De acordo com Demczuk Jr e Ribani (2015), no interior das cápsulas as

sementes (com diâmetro médio de 0,4 cm) são arredondados e revestidas por uma camada pastosa de coloração avermelhada, os quais tornam-se secos, duros e de coloração escura com o amadurecimento.

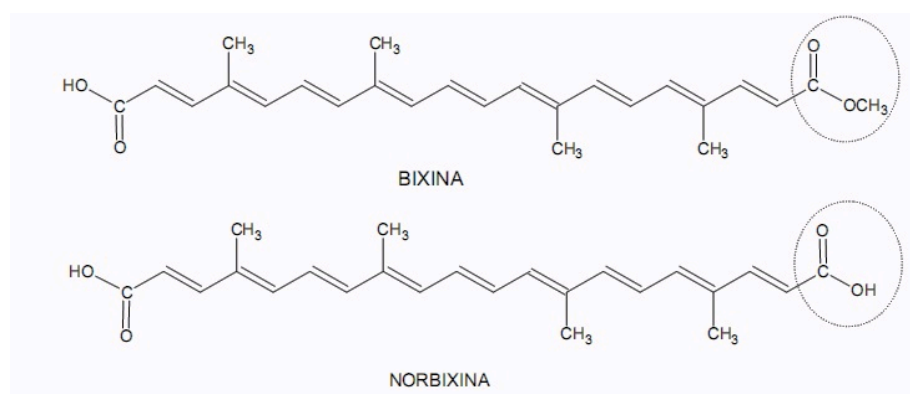
3.5.2 Componentes das sementes do urucum

A polpa avermelhada que envolve as sementes do urucum é rica em carotenóides como o beta-caroteno, bixina e norbixina, sendo que a bixina corresponde a mais de 80% dos carotenóides presentes na polpa e representa, em média, 2,5% do peso das sementes desidratadas (SANTANA, *et al.*, 2008; RODRIGUES-ÁVILA *et al.*, 2011). De acordo com Costa e Chaves (2005), o segundo carotenóide mais encontrado nas sementes é a norbixina que é obtida pela saponificação da bixina.

Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis e reativos que possuem duplas ligações conjugadas responsável pelo seu poder corante e, também pela atividade antioxidante, além de desempenhar ação pró-vitamina A. Sua atividade antioxidante é devido sua reação com o oxigênio reativo, protegendo assim as células dos danos oxidativos provocados por radicais livres e por espécies reativas de oxigênio (MORAIS, 2006).

A bixina, de cor avermelhada, é considerada um apocarotenóide monometil éster carboxílico que apresenta uma estrutura química composta por uma cadeia isoprênica de 24 carbonos, contendo um ácido carboxílico e um éster metílico nas extremidades, apresentando assim, a fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$. É lipossolúvel, solúvel em clorofórmio, acetona, éter etílico, etanol e insolúvel em água. Já a norbixina, formado por dois grupos de ácidos carboxílicos nas extremidades ($C_{24}H_{28}O_4$) é o derivado desmetilado da bixina sendo um composto hidrossolúvel, insolúvel em álcool, propileno glicol, óleo e gordura (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004). A figura 3 mostra a estrutura química dos principais pigmentos do urucum bixina e norbixina:

Figura 3: Estrutura química dos pigmentos do urucum: bixina e norbixina.



Fonte: Costa e Chaves (2005)

De acordo com Satyanarayana, Prabhakar e Rao (2003), ambos corantes do urucum apresentam duas configurações estereoquímicas, isto é, cis e trans. A cis-bixina é solúvel na maioria dos solventes orgânicos polares, onde apresenta uma coloração mais alaranjada, porém insolúvel em óleos vegetais, podendo se converter rapidamente em trans isômeros devido a sua instabilidade. A trans-bixina tem propriedades semelhantes ao isômero cis, porém apresenta coloração vermelha em solução e é solúvel em óleo vegetal. Os isômeros cis-bixina, trans-bixina, cis-norbixina e trans-norbixina diferem em algumas características físicas. Em extratos nas condições normais, há predomínio da cis-bixina e cis-norbixina, mas em condições de aquecimento são parcialmente mudadas para trans-bixina e trans-norbixina (SILVA, 2007).

3.5.3 Métodos de extração e identificação dos compostos do urucum

Os compostos das sementes do urucum podem ser extraídos por diferentes processos: mecânicos (atrito e raspagem) e físico-químicos (solventes, enzimas). A extração feita com solventes pode ser feita por três métodos básicos, extração alcalina quando é feita com solução de hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de potássio (KOH) e resulta na conversão da bixina em norbixina, extração com óleo de soja ou milho e a extração por meio de solventes orgânicos como o clorofórmio, etanol, acetona e propilenoglicol (ALVES, 2001).

A extração dos carotenóides das sementes de urucum tem sido realizada

utilizando óleos vegetais, solventes orgânicos ou soluções alcalinas de NaOH, KOH, NaHCO₃ e NH₄OH. Para Garcia et al. (2012), extrações realizadas por meio de solventes orgânicos alcançam concentrações próximas a 92% de carotenóides.

Tocchini e Mercadante (2001) determinaram, por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), os teores de bixina e norbixina em várias marcas e lotes de colorífico após extração com ultra-som sucessivamente com 5, 4 e 3mL de metanol. Foram analisadas sete marcas diferentes de colorífico (de dois a cinco lotes de cada marca), totalizando vinte e cinco amostras. A bixina foi o carotenóide majoritário encontrado nas diferentes marcas de colorífico, em teores que variaram de 154 a 354mg/100g, enquanto a norbixina esteve presente em traços (2 a 9mg/100g).

Rios e Mercadante (2004) isolaram padrões de bixina e de norbixina e verificaram o efeito de diferentes condições na extração de bixina em “snacks” extrusados e sua conversão em norbixina durante a saponificação, utilizando CLAE em fase reversa. Através de cristalizações foram obtidos cristais de bixina com 98% de pureza e norbixina, purificada por coluna de sílica-gel, com pureza de 93%. Os cromatogramas evidenciaram que o melhor solvente para extração foi acetato de etila, sendo necessário realizar 8 extrações sucessivas para completar a remoção dos pigmentos. Para obter 100% de conversão de bixina em norbixina, a saponificação deve ser efetuada com 35 mL de KOH 35% metanólico com agitação a 50°C por 20 minutos.

Segundo Costa e Chaves (2005), os métodos de extração dos pigmentos da *Bixa orellana* L., seja para determinação da composição química ou averiguação de atividades sobre organismos vivos, são realizados com o uso de solventes, tais como propilenoglicol, óleo, água pura e soluções alcalinas. Os autores realizaram a extração das sementes de *Bixa orellana* L. com uma solução de NaOH e observaram que este tipo de extração conduziu ao melhor rendimento de bixina quando comparado à extração com acetona, à temperatura ambiente e em Soxhlet.

Silva, Nachtigall e Stringheta em 2009, estudaram o efeito de diferentes concentrações de KOH (0,6%, 1%, 2%, 3%, 4% e 5%) e temperatura de extração (25°C, 50°C, 60°C e 70°C) na reação de saponificação dos principais pigmentos de urucum. O progresso da reação foi acompanhado pela quantificação do teor de bixina e de norbixina por meio de CLAE. A maior concentração de base propiciou a maior conversão de bixina em norbixina (KOH 5% - bixina: 0,44 g.100g⁻¹, norbixina: 1,43 g.100g⁻¹) e com a menor concentração não ocorreu conversão (KOH 0,6% - bixina:

2,00 g.100g⁻¹, norbixina: não detectada). A elevação da temperatura de extração esteve associada à redução do teor de bixina no meio e ao aumento do teor de norbixina (T70°C - bixina: 0,01 g.100g⁻¹, norbixina: 2,34 g.100g⁻¹; T25°C - bixina: 1,04 g.100g⁻¹, norbixina: 0,78 g.100g⁻¹). Os autores concluíram que para a obtenção do pigmento hidrossolúvel são aconselhadas concentrações mais elevadas, podendo estar associadas a aquecimento.

A extração da bixina pode ser realizada seguindo vários protocolos, no entanto, uma metodologia bastante utilizada é pelo método do KOH, que é uma base forte que promove a saponificação parcial do grupo éster da bixina em sua forma hidrossolúvel, ou seja, o sal da norbixina. Segundo Silva (2007), a concentração mais utilizada, em geral é de 5%, já que trabalhos corroboram que a saponificação ocorre em concentrações de KOH acima de 1%, ou ainda, que a saponificação de bixina em norbixina ocorra em valores de pH maiores de 10. Sendo assim, a concentração do solvente e o pH possui maior dependência para reação de saponificação que outros fatores, como temperatura (NACHTIGALL *et al.*, 2009).

Desta forma, Nachtigall *et al.* (2009) estudaram 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. O progresso da reação foi acompanhado por CLAE e por colorimetria, e os dados obtidos foram avaliados por análise de regressão. Os teores de bixina e do sal da norbixina foram dependentes da concentração da base utilizada na extração, enquanto o tempo não apresentou efeito no andamento da reação de saponificação. A maior concentração de base propiciou a maior conversão de bixina em sal de norbixina, o que foi confirmado pela avaliação dos parâmetros colorimétricos.

Silva, Nachtigall e Stringheta (2009) verificaram a eficiência de diferentes solventes na extração de pigmentos das sementes de urucum, bem como produziram e analisaram as características dos corantes obtidos. Os solventes empregados foram KOH 0,6%, NH₄OH 2%, NH₄OH etanólico 2% e etanol comercial. A eficiência da extração foi avaliada pelo residual de bixina presente nas sementes ao término das extrações e os corantes foram caracterizados com relação ao teor de umidade, sólidos totais, cinzas, resíduo de amônia, teor de potássio e pelo teor de bixina e norbixina. O solvente mais eficiente foi o NH₄OH etanólico 2%. Em todos os corantes elaborados, o pigmento majoritário foi a bixina, mesmo em extratos obtidos por extração com solução alcalina.

A cromatografia gasosa é um processo de análise química instrumental por separação de compostos químicos de uma amostra complexa. Na cromatografia gasosa, a amostra é injectada no topo de uma coluna cromatográfica e a eluição é feita por fluxo de um gás de arraste inerte (fase móvel). A fase móvel não interage com as moléculas do analito, a sua função é transportar o analito através da coluna. O gás de arraste mais utilizado é o hélio, o nitrogênio, e o hidrogênio, onde o mesmo deve ser quimicamente inerte e a sua escolha depende da disponibilidade, pureza, consumo e tipo de detector utilizado (SKOOG; WEST; HOLLER, 2000; AFONSO, 2002).

De acordo com Ferreira (2011), para determinação de compostos polares por GC-MS é necessário a utilização da etapa de derivatização, que permite a modificação da funcionalidade da molécula, aumenta a sua volatilidade, diminui a polaridade e melhora a sua estabilidade. A derivatização permite também a redução da adsorção do analito no GC, melhorando a resposta no seu detector e uma separação mais eficiente dos picos cromatográficos.

Vilar (2015) verificou o potencial antileishmania e a toxicidade dos fitoconstituintes da fração oleosa da semente de *B. orellana L.* e da bixina, visando comprovar sua atividade biológica, e eficácia terapêutica. A bixina foi caracterizada através de espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e a fração oleosa por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas, sendo o ácido linoléico o composto majoritário na fração oleosa.

Capella *et al.* (2016) identificaram os principais compostos presentes no extrato oleoso de *Bixa orellana L.* baseando-se nos estudos de Kumari, Reddy e Jha (2011) e Monzote *et al.* (2014) utilizando cromatógrafo a gás acoplado ao detector de massas. As quantificações foram estabelecidas por área normalizada, e as identificações dos compostos pelo espectro de massas, utilizando a biblioteca NIST 8 do GC/MS, a qual armazena informações de compostos previamente identificados. Na caracterização cromatográfica, foram encontrados os seguintes compostos majoritários: ácido linoleico (37%), geranil linalool (28%), ácido palmítico (16%) e ácido oleico (9%), além de ácido esteárico (4%), escaleno (3%) e geranil- α -terpinene (3%).

3.5.4 Usos e ações farmacológicas

O uso do urucum é amplamente difundido em nossa cultura, particularmente na alimentação onde é empregado como corante, especialmente na indústria de condimentos para fabricação de coloríficos, temperos e outros produtos usados na gastronomia brasileira, que representam cerca de 60% do volume total de urucum comercializado no Brasil (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001).

Com o objetivo de avaliar a mutagenicidade e a antimutagenicidade do annatto, em pigmento natural extraído da *Bixa orellana* L. e amplamente utilizado como corante nos alimentos, Alves de Lima *et al.* (2003) realizaram teste de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos suíços machos tratados com uma das três concentrações de annatto (1330, 5330 e 10.670 ppm), incorporadas na dieta. Os dados indicaram que o urucum, para as condições utilizadas, não é nem mutagênico e nem inibidor de mutações induzidas.

Tem sido relatado na literatura o uso do urucum como defensor das células sobre os efeitos nocivos dos raios solares, prevenindo queimaduras. Esta propriedade tem sido atribuída aos tocotrienóis presentes no urucum, que protegem os queratinócitos dos danos causados pelos raios UVB ao DNA. Desta forma, o extrato oleoso do urucum é utilizado em cosmética em produtos bronzeadores e protetores solares (GLÓRIA, 2006).

Na busca de novas ações biológicas para os flavonóides e também para os corantes do urucum, Lima *et al.* (2001) testaram os carotenóides bixina e norbixina, e o flavonóide quercetina, também presente no urucum, isoladamente e associado à bixina, para verificar os seus eventuais efeitos hipolipidêmicos em coelhos. Nesse trabalho a bixina reduziu o colesterol total e a quercetina reduziu os triacilgliceróis.

Lima *et al.* (2010) avaliaram a ação de alguns flavonóides e corantes do urucum no tratamento da hiperlipidemia em coelhos e os resultados mostraram que a maior parte dos flavonóides estudados reduziram mais o triacilglicerol do que o medicamento colestiramina. Verificaram também, *in vitro*, que bixina, norbixina, apigenina e luteolina aumentaram a atividade da lipase. Em outro estudo Franco, Oliveira e Barreiro Neto (2013) avaliaram a ação dos corantes naturais do urucum (*Bixa orellana* L.) no tratamento de hiperlipidemia em coelhos. Em doses 0,5, 1,0 e 1,5 mg/Kg de bixina foram eficazes na redução do colesterol sanguíneo em todos os coelhos testados.

Somacal (2012) avaliou o potencial antioxidante, anti-inflamatório e antiaterogênico da norbixina em modelo de aterosclerose em coelhos. Os animais receberam ração regular (controle) ou uma dieta aterogênica (0,5% de colesterol) sozinha ou suplementada com norbixina (10, 30 ou 100 mg/kg) por 60 dias. A atividade das enzimas antioxidantes, o perfil lipídico, os marcadores de estresse oxidativo e inflamação e as alterações histopatológicas foram avaliados no soro e no tecido aórtico dos coelhos hipercolesterolêmicos. A autora concluiu que a suplementação com norbixina melhorou o perfil lipídico, diminuiu o estresse oxidativo e impediu mudanças na atividade da enzima paraoxonase, porém não impediu a formação de placas ateroscleróticas.

Keong *et al.* (2011) avaliaram a atividade anti-inflamatória de um extrato aquoso bruto de folhas de *Bixa orellana* (AEBO) e para examinar o possível envolvimento do óxido nítrico (NO) em seu mecanismo anti-inflamatório. Os resultados desse estudo mostraram que AEBO possui uma atividade anti-inflamatória significativa contra a fase aguda da inflamação, que pode ser devido à sua ação antibradicínica e na redução da produção de NO.

Moreira (2012) avaliou o efeito protetor da bixina sobre os danos hepáticos provocados pelo tetracloreto de carbono (CCl₄) em ratos. Neste trabalho a bixina protegeu dos danos hepáticos provocados pelo CCl₄ pela diminuição da liberação das enzimas ALT e AST. A bixina também protegeu o fígado contra os efeitos oxidantes do CCl₄, uma vez que impediu a diminuição da atividade da enzima GR e dos níveis de GSH e NADPH. A peroxidação dos lipídios de membrana também foi inibida pela bixina. Além disso, o dano histopatológico do fígado foi significativamente reduzido pelo tratamento com a bixina. A autora concluiu que o efeito protetor da bixina contra a hepatotoxicidade causada pelo CCl₄ está relacionado com a atividade antioxidante da substância.

Segundo Santos *et al.* (2012), as propriedades antioxidantes da bixina estão associadas à sua capacidade de eliminar os radicais livres, o que pode reduzir os danos e proteger os tecidos contra a toxicidade causada por fármacos anticancerígenos tais como a cisplatina. Para demonstrar isso, os autores avaliaram a genotoxicidade e antigenotoxicidade da bixina na toxicidade induzida por cisplatina em células PC12. A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio MTT, a mutagenicidade, a genotoxicidade e o efeito protetor da bixina foram avaliados utilizando o teste de micronúcleos e o ensaio de cometas. As células PC12 foram tratadas com bixina

(0,05, 0,08 e 0,10 µg / mL), cisplatina (0,1 µg / mL) ou uma combinação de bixina e cisplatina. Os resultados desse trabalho sugerem que a bixina pode funcionar como um agente protetor, reduzindo o dano do ADN induzidos por radicais livres.

Moreira (2013) avaliou o potencial antioxidante e quantificaram os teores de bixina pelo método KOH 5% e compostos fenólicos totais pelo método de Folin-ciocauteau. Foram utilizadas três variedades de sementes: Peruana Paulista, Embrapa 37 e Focinho de Rato e três marcas de urucum em pó encapsulado. Os resultados sugeriram que a utilização de corantes de urucum pode proporcionar uma ação preventiva de doenças contribuindo de forma benéfica à saúde do ser humano.

Yong *et al.* (2013) determinaram os principais constituintes químicos do extrato aquoso de *B. orellana* (AEBO) e avaliaram a atividade anti-histamínica durante a inflamação aguda induzida em ratos. Para avaliar o efeito inibitório do AEBO nos mediadores bioquímicos da permeabilidade vascular, determinaram os níveis de óxido nítrico (NO) e o fator de crescimento do endotelial vascular (VEGF) em tecidos da pata dos animais tratados com histamina. Os achados experimentais demonstraram que a atividade antiinflamatória da AEBO foi devido ao seu efeito inibitório sobre a permeabilidade vascular, que foi suprimida como resultado da redução da expressão de mediadores bioquímicos como o NO e VEGF nos tecidos.

Roehrs *et al.* (2014) investigaram os efeitos da administração oral de carotenóides bixina e norbixina sobre os níveis de glicose, perfis lipídicos e parâmetros de estresse oxidativo em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (STZ). O tratamento com bixina preveniu a oxidação de proteínas, a produção de óxido nítrico e atuou na recuperação da atividade de superóxido dismutase. Esses achados sugerem que a bixina pode ter um efeito anti-hiperglicêmico, melhora os perfis lipídicos e protege contra dano celular induzido pelo estresse oxidativo no estado diabético.

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 por meio de análise histomorfométrica. O extrato de urucum contendo 2,5% de norbixina não é inócua aos tecidos cutâneos e possui efeitos pró-inflamatórios e pró-angiogênicos durante o processo de reparo tecidual cutâneo em ratos, interferindo no processo fisiológico de cicatrização. Os valores de atividade antioxidante foram superiores aos do antioxidante sintético que apresentou 63,62% de inibição. Tais resultados sugerem que a utilização de corantes de urucum pode proporcionar uma

ação preventiva de doenças contribuindo de forma benéfica à saúde do ser humano.

Capella *et al.* (2016) avaliaram a ação do extrato oleoso de urucum na cicatrização de feridas cutâneas abertas em modelo experimental em ratos Wistar. As feridas cutâneas foram diariamente tratadas com: extrato de urucum 0,1%, extrato de urucum 0,01%, vaselina (V) e solução fisiológica (SF), por até 21 dias. Os grupos tratados com extrato de urucum 0,1% e 0,01% apresentaram clinicamente maior presença de epitelização aos sete dias e maior retração cicatricial aos quatro dias. Na análise histológica, os grupos tratados com extrato de urucum 0,1% e 0,01% apresentaram aos 4 e 7 dias maior quantidade de fibrina e inflamação que os grupos tratados com V e SF. Os autores concluíram com este estudo que o extrato oleoso de urucum acelera o processo cicatricial nos primeiros dias.

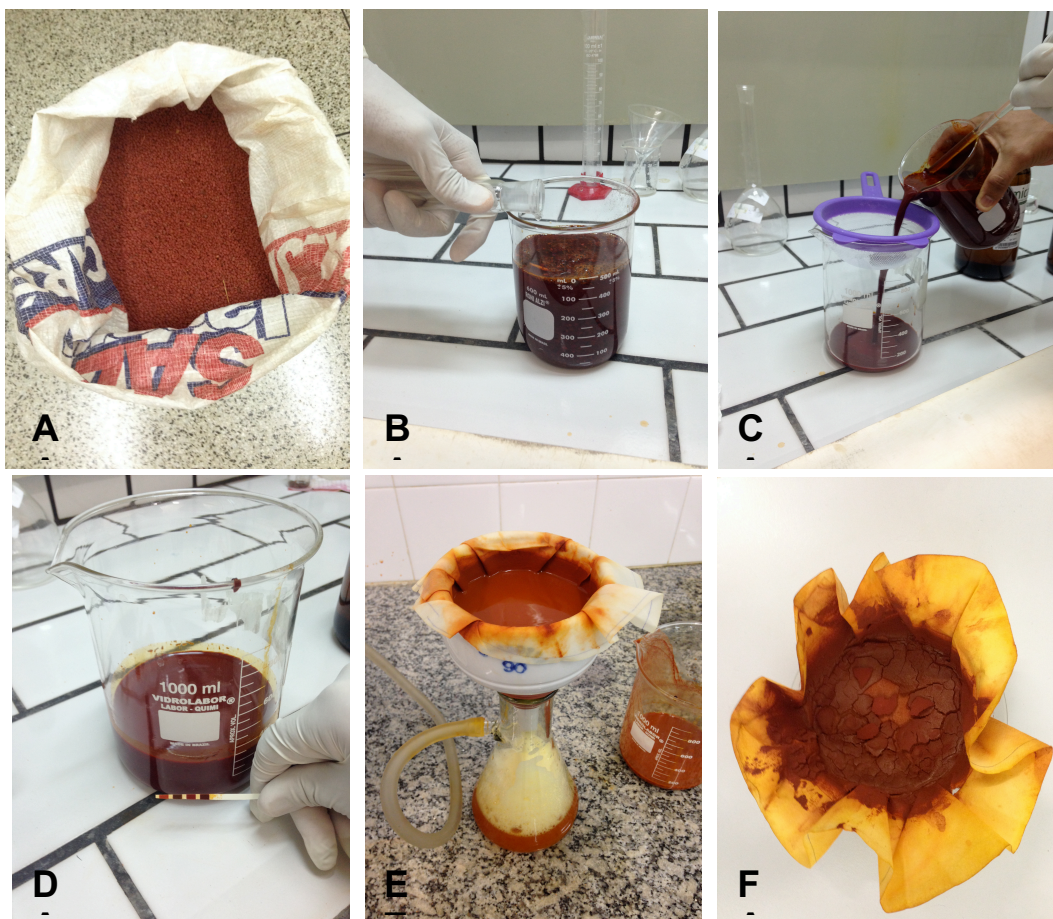
4 METODOLOGIA

4.1 Extração dos compostos do urucum

Foram utilizados sementes da urucum (*Bixa orellana* L.) adquiridas no Mercado Central de Teresina em fevereiro de 2015, produzidas e colhidas na região norte do Estado do Pará (Figura 4A).

Para a extração dos compostos de urucum inicialmente foram pesadas 100 g de sementes em uma balança de precisão da marca Gehaka BK2000. Após a pesagem, foram adicionados 200 ml de éter etílico P.A. para retirar os componentes lipossolúveis da solução, agitando a solução por 30 minutos manualmente. As sementes foram separadas e o líquido descartado. Foram adicionados 500 ml de hidróxido de potássio (KOH) 4% com agitação manual por cinco minutos (Figura 4B). Foi realizada nova filtração com peneira comum descartando as sementes ficando só a solução (Figura 4C), que foi levada para uma chapa de aquecimento com controle de temperatura a 70° C por 1 hora. Em seguida foi efetivada a padronização do pH com ácido clorídrico concentrado (HCl) através da análise das tiras pH-Fix até atingir escala 5 (Figura 4D). A solução foi levada para a filtração à vácuo para obtenção dos compostos das sementes do urucum (Figura 4E). O filtrado foi levado a secagem em estufa a 40° C por 12 horas até se obter um extrato seco (Figura 4F).

Figura 4: Obtenção do extração seco do urucum: (A) sementes de urucum, (B) adição de KOH 4% as sementes, (C) separação das sementes (D) determinação do pH, (E) filtração à vacuo da solução e (F) extrato seco.



Fonte: Autor

4.2 Reação de derivatização por silição e aplicação na Cromatografia Gasosa acoplada no Espectrômetro de Massas CG/EM

Em um balão de fundo redondo de 5 ml foram adicionados cerca de 5 mg da amostra extraída, e vedou-se o mesmo com um septo de borracha. O sistema foi purgado com nitrogênio gasoso (N_2), e adicionou-se 2 gotas de piridina destilada para facilitar a dissolução. Em seguida, com o auxílio de agitador magnético, a mistura reacional foi agitada até a dissolução completa da amostra, e por fim 100 μ 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 N₂ e aquecido em banho de areia de 70 °C a 80 °C por 1 hora. Para a verificação da reação de sililação 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⁻¹), previamente sililada, 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⁻¹; programação de análise: temperatura inicial a 100 °C indo até 300 °C com taxa de 10 °C min⁻¹; Temperatura do injetor: 290 °C e temperatura da interface: 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 da Reparação Óssea

4.3.1 Procedimentos Éticos

Esta pesquisa foi realizada de acordo com a Declaração Universal dos Direitos dos Animais e os princípios éticos da experimentação animal emitido 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, com número de protocolo 069/14.

4.3.2 Seleção e Manejo dos Animais

O universo estudado foi de animais da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, machos, mantidos desde o nascimento no Biotério da Faculdade Integral Diferencial – FACID/DeVry e com 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 (LabinaTM) e água *ad libidum*.

Foram utilizados 40 animais, divididos em quatro grupos de 10 ratos, distribuídos conforme a intervenção terapêutica adotada. Cada grupo, por sua vez, foi dividido em dois subgrupos (n=5) conforme o período de eutanásia dos animais que correspondeu ao período de observação no estudo de 14 e 30 dias. Os ensaios biológicos e os procedimentos histológicos foram realizados no laboratório de Fisiologia e no laboratório de Técnicas Histológicas da Faculdade Integral Diferencial - FACID/DeVry respectivamente.

4.3.3 Preparo Cirúrgico dos Defeitos Ósseos

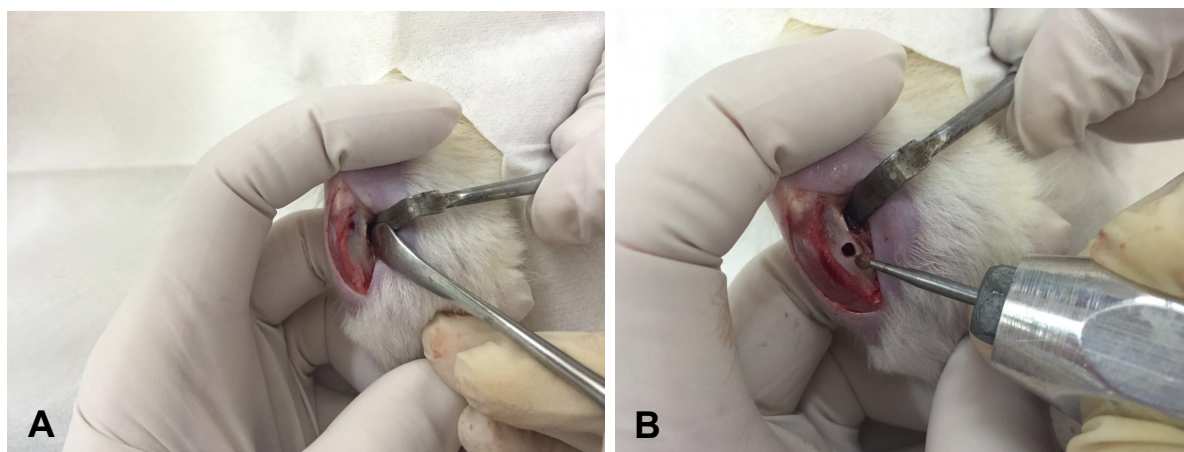
Para a realização dos procedimentos experimentais, os animais foram previamente pesados e receberam por via subcutânea, uma pré-anestesia com atropina no volume de 0,04 ml/100g, aguardando repouso de 15 minutos para o procedimento anestésico.

Os animais então foram submetidos à anestesia dissociativa com Cloridrato de Quetamina (50 mg/mL) (Dopalen, Sespo Indústrias e Comércio Ltda, Paulínea-SP) e Xilazina (20 mg/mL) (Anasedan, Sespo Indústrias e Comércio Ltda, Paulínea-SP) via intra-muscular na proporção de 1:1; com o volume de 0,1mL para cada 100g do peso do animal na dose de 4 mg/Kg de peso (MASSONE, 2003).

A preparação cirúrgica do defeito foi realizada na tíbia direita dos ratos seguindo o protocolo de Santos (2006) e Prado *et al.* (2006), e teve início com a tricotomia da região a ser incisada e antissepsia com clorexidina a 2%. A área a ser 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, músculos e periósteo para a exposição da superfície óssea (Figura 5A).

Com uma broca esférica de aço n° 8 montada em um micromotor cirúrgico (Driller BLM 600 Plus), sob baixa e intermitente rotação, com irrigação constante de solução fisiológica 0,9% (Labormédica ®), foi realizado um defeito ósseo monocortical com diâmetro de 2 mm e profundidade até atingir o canal medular (Figura 5B).

Figura 5: (A) Incisão e exposição do osso na tíbia e (B) Confecção dos defeitos ósseos cirúrgicos com broca esférica n° 8.



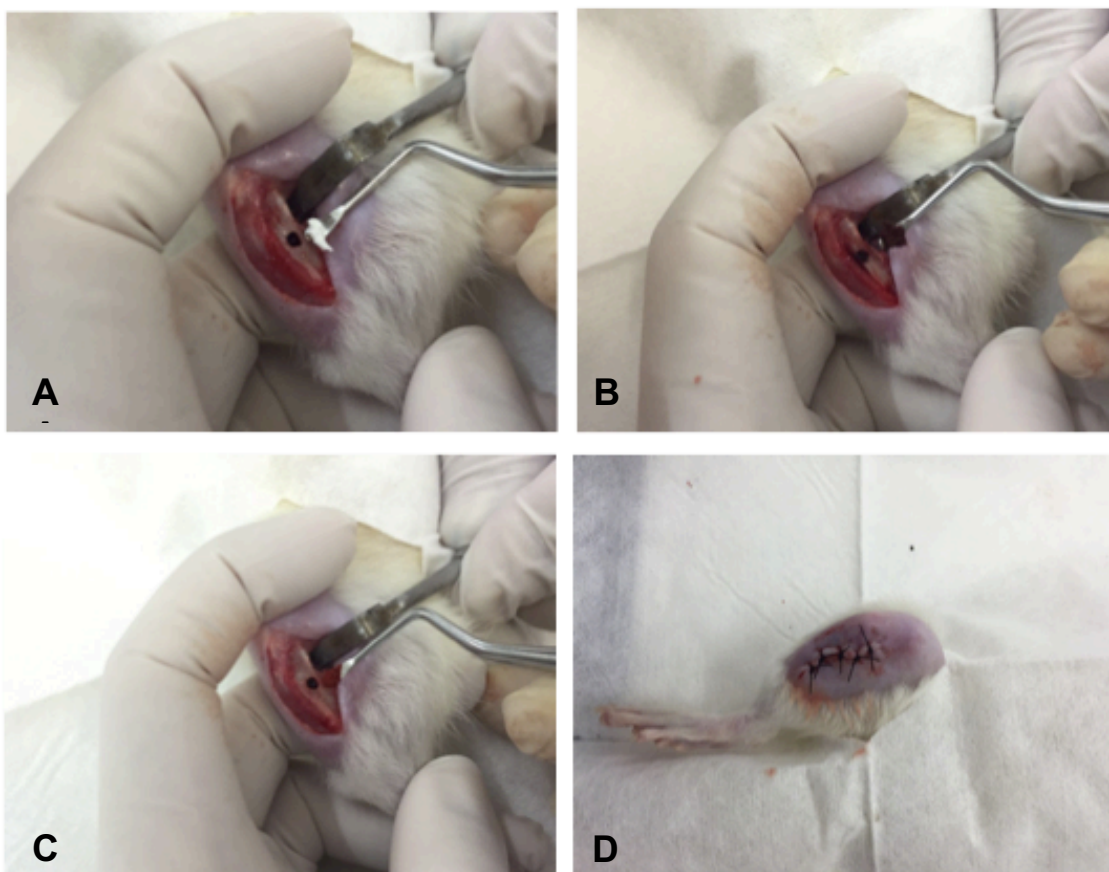
Fonte: Autor

4.3.4 Intervenção Terapêutica

Nos animais do grupo G1, os defeitos ósseos foram preenchidos somente por coágulo sanguíneo do próprio animal; no grupo G2 foram preenchidos com enxerto ósseo liofilizado (Figura 6A); no grupo G3 foram preenchidos com extrato seco contendo compostos das sementes do urucum (figura 6B) e no grupo G4 foram preenchidos com uma mistura de enxerto ósseo liofilizado e extrato seco contendo compostos das sementes do urucum na proporção 1:1 (Figura 6C). Em seguida, foi procedida a sutura por planos, sendo utilizado o fio de seda 3.0 (Somerville, São Paulo, RJ, Brasil), de modo que o periósteo fosse reposicionado sobre os materiais enxertados (Figura 6D).

Para terapia antimicrobiana, foi administrado Pentabiótico (Fort Dodge® Saúde Animal Ltda, Campina, SP, Brasil) de amplo-espectro, via intramuscular profunda em dose única com o volume de 0,02ml/100g (MASSONE, 2003).

Figura 6: (A) Defeitos ósseos preenchido com osso liofilizado, (B) com extrato seco contendo compostos das sementes do urucum, (C) com a mistura de enxerto ósseo liofilizado e extrato seco contendo compostos das sementes do urucum na proporção 1:1 e (D) Sutura.



Fonte: Autor

4.3.5 Eutanásia e Descarte dos Animais

Após o período de 14 e 30 dias do tratamento, os animais foram eutanasiados de acordo com os princípios éticos adequados (CONCEA) para a dissecação das amostras. Os animais receberam uma sobredosagem de Tiopental sódico (0,05 ml/100g) via intraperitoneal.

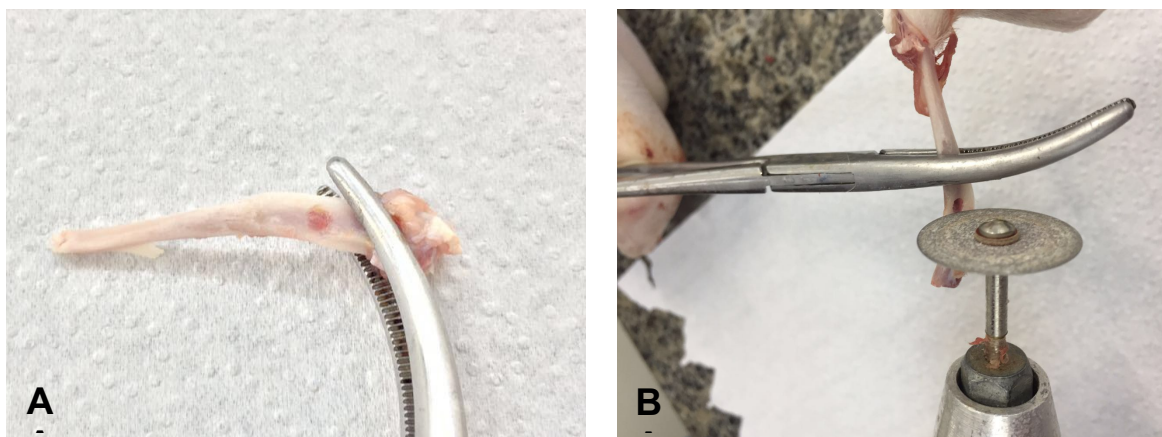
Após a eutanásia dos animais, as tíbias onde foram confeccionados os defeitos ósseos foram removidas (Figura 7A) e imediatamente seccionadas transversalmente no centro do defeito utilizando-se um disco carborundum montado em mandril (K.G. Sorensen®) para peça reta (Kavo®) acoplado ao micromotor elétrico (Driller BLM 600

Plus) sob baixa rotação, com irrigação constante de solução fisiológica 0,9% (Labormédica ®) para evitar a desidratação dos blocos ósseos (Figura 7B).

Metade da amostra foi acondicionada em papel laminado, rotulados com esparadrapo, acondicionada nas cubas de inseminação e armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C) para que não ocorressem alterações estruturais e moleculares da amostra, pois a fixação química não é aconselhável para este sistema devido à emissão de fluorescência das substâncias fixadoras.

A outra metade da amostra foi colocada em potes contendo solução fixadora de formol a 10% identificados de acordo com o grupo para ser encaminhadas para os procedimentos histológicos. Os cadáveres foram congelados em freezer para posterior descarte pelo técnico responsável pelo biotério da Instituição.

Figura 7: (A) Tíbia contendo o defeito ósseo e (B) corte transversal do defeito com disco diamantado.



Fonte: Autor

4.3.6 Análise por Microscopia Óptica

Logo após a eutanásia dos animais, as porções ósseas onde foram produzidos os defeitos foram fixadas em formol à 10% por 48h, e descalcificadas em solução de ácido fórmico 20% por 7 dias. Em seguida, as peças passaram pelo processo laboratorial de rotina: desidratação em séries crescentes de etanol (70-100%), diafanização em xilol, seguido de inclusão em parafina. Os blocos de inclusão foram seccionados, em micrótomo convencional, em uma espessura de 4 μ m e os cortes obtidos foram submetidos ao processo de coloração tradicional pela técnica da

Hematoxilina e Eosina (HE) para serem examinados em microscópio óptico. As lâminas foram numeradas de acordo com o número do animal e subgrupo ao qual pertenciam.

A análise descritiva histológica foi baseada nos critérios: presença de infiltrado inflamatório, necrose, formação de fibrose, neoformação óssea (tecido ósseo imaturo e lamelar) e reabsorção óssea, e foram realizados por um Patologista da instituição com as lâminas codificadas.

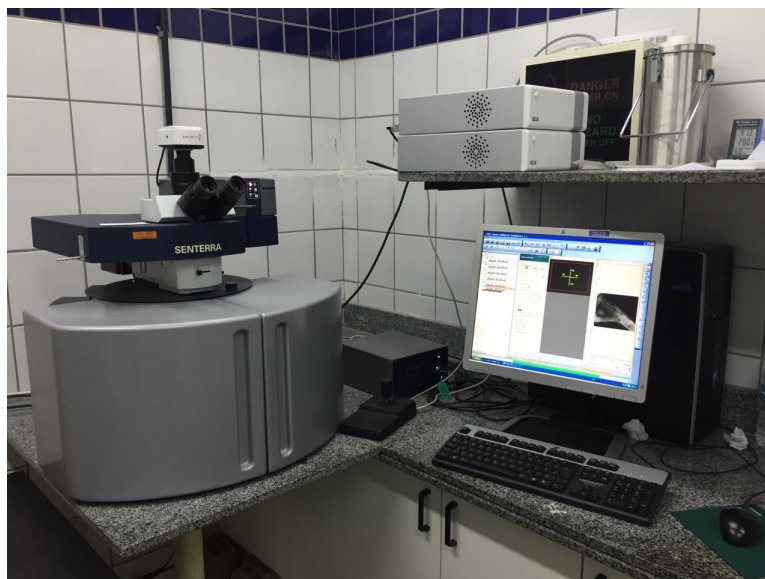
4.3.7 Análise por Espectroscopia Raman Confocal

Para identificar os modos vibracionais característicos das amostras bem como os grupos funcionais, utilizou-se espectroscopia Raman Confocal (Figura 8). Os espectros Raman foram registrados utilizando-se um equipamento da marca Bruker, modelo Senterra, com microscópio Olympus BX50, com o monocromador ligado a um dispositivo de carga acoplado (CCD – “Charge-Coupled Device”). Foi utilizada a objetiva 20x para a focalização das amostras. Como fonte de excitação para caracterização do espectro Raman foi utilizado o laser 785 nm, com potência de saída de 10 mW. Os dados foram obtidos com 5 acumulações de 15 s com ajuste automático de resolução 3-5 cm^{-1} . A região para a obtenção dos espectros foi de 900-1200 cm^{-1} .

Para a análise por Espectroscopia Raman, optou-se analisar apenas as amostras dos animais eutanasiados com 30 dias para comparar o padrão de incorporação de hidroxapatita com o osso normal durante o reparo ósseo. Após, os blocos ósseos contendo os defeitos serem focalizados no microscópio, dois pontos na região cortical no interior do defeito foram explorados em todos os grupos com uma distância de 10 μm (Figura 9B), e no grupo controle G1 além desses dois pontos, um outro ponto na cortical óssea normal foi explorado para servir como controle positivo (Figura 9A). Ao final, foram obtidos 45 espectros em 20 amostras. Desse número, 40 espectros foram adquiridos na área do defeito ósseo (10 espectros por grupo); e 5 espectros em área de osso hígido (grupo controle positivo).

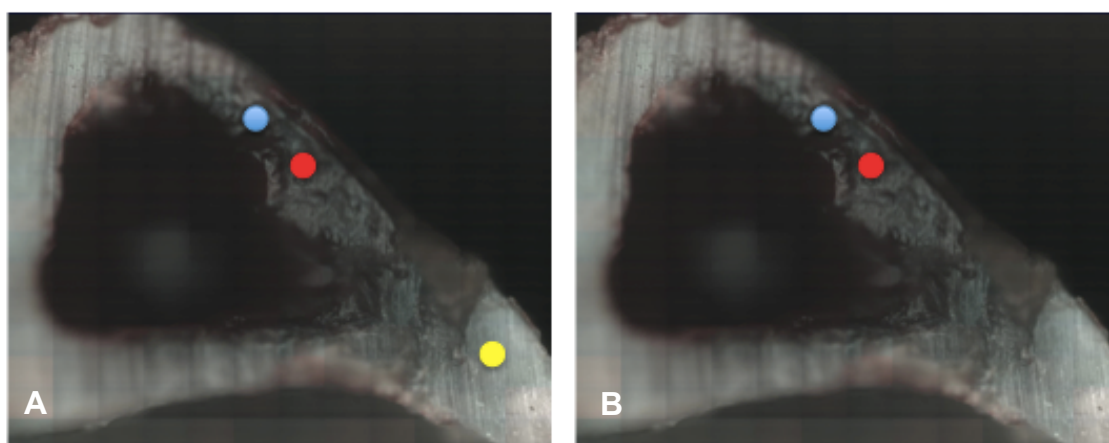
As áreas dos picos Raman de $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ (fosfato) e $\sim 1070 \text{ cm}^{-1}$ (carbonato) que representam um importante marcador de conteúdo mineral ósseo foram analisadas para caracterizar alterações do componente mineral do osso neoformado (MAIA et al., 2014).

Figura 8: Espectrômetro Raman (Senterra, Bruker) usado no estudo.



Fonte: Autor

Figura 9: (A) Fotomicrografia Confocal Raman (50X) da tíbia com dois pontos (azul e vermelho) no interior do defeito e um na cortical óssea normal (amarelo) representando os locais dos espectros selecionados do grupo G1 e (B) nos grupos G2, G3 e G4.



Fonte: Autor

Para filtragem do sinal Raman e cálculo das áreas internas dos picos $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ (fosfato) e $\sim 1070 \text{ cm}^{-1}$ (carbonato) foi utilizado o software PeakFit®.

Em cada espectro obtido dos pontos explorados das amostras, foi calculada a área interna do pico no intervalo de $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ para caracterizar alterações do

componente mineral do osso neoformado em cada espectro (MAIA et al., 2014) e foi denominada “Área 1”. A área do pico 1070 cm⁻¹ 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 fazer a integração de ambas as áreas para suprimir as possíveis variações durante o experimento, como oscilação da potência do laser, diferenças de focalização e geometria das amostras. Pois se houvesse variação nos parâmetros empregados durante o experimento, esta seria 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, a mineralização do osso neoformado foi considerada proporcional à razão entre as Áreas 1 e 2.

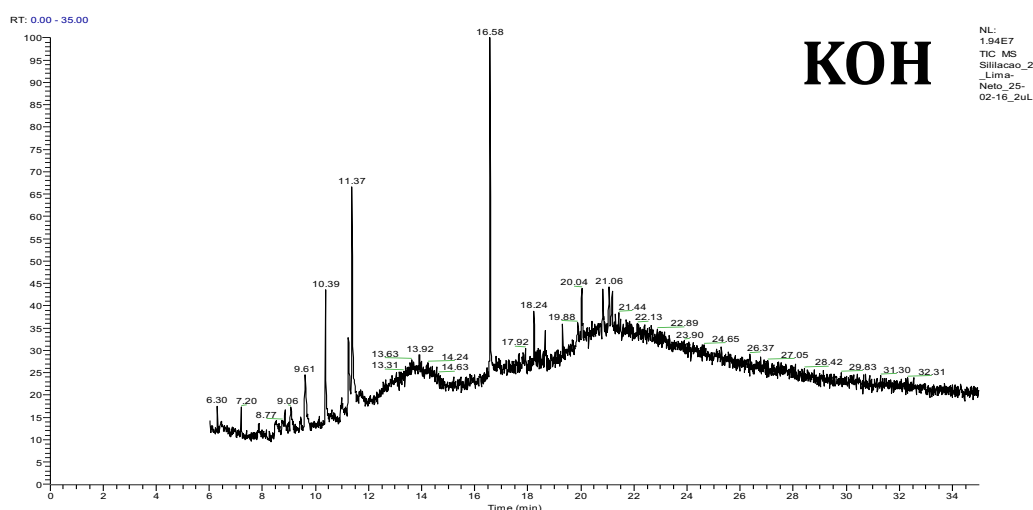
4.3.8 Análise Estatística

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

5 RESULTADOS

Neste estudo a análise por CG/EM deu origem um cromatograma, onde cada pico representa um composto diferente (Figura 10). Foram escolhidos por critério próprio, levando em consideração a altura do pico, 11 compostos. Dos 11 foi possível determinar cinco substâncias como majoritários (ácido hexadecanóico trimetilsilado, ácido heptadecanóico trimetilsilado, bixina trimetilsilado, norbixina trimetilsilado e dimetil- β -caroteno trimetilsilado) como apresentado na figura 11. E as abundâncias relativas são 10,32 %; 11,89 %; 25,82 %; 26,55 %; 4,12 %, sendo que a bixina e a norbixina são maiorias (Tabela 1).

Figura 10 – Cromatograma de íons totais do extrato sililado de *Bixa orellana* por análise em CG-EM.



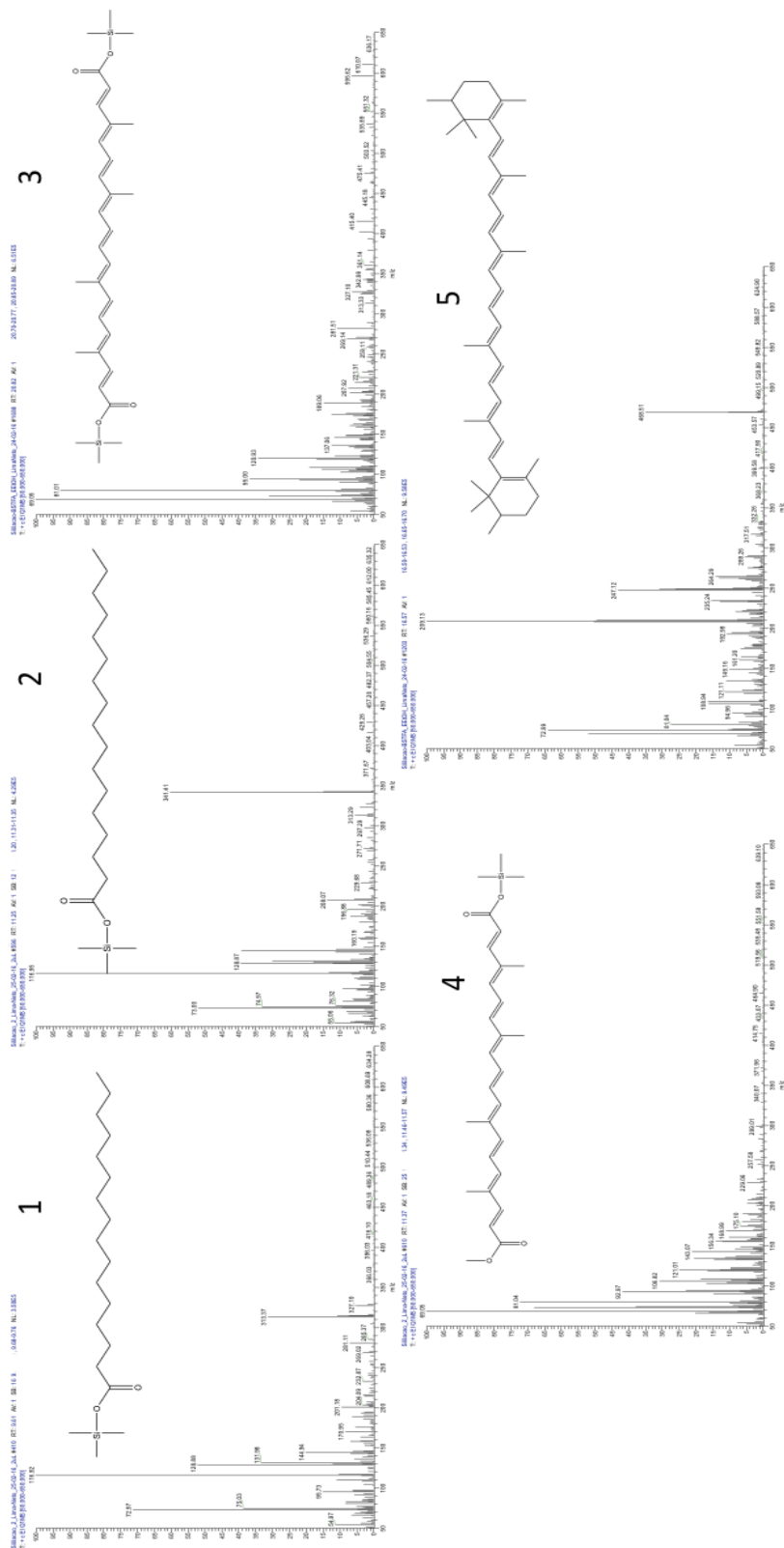
Fonte: Autor

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

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- β -caroteno	563 (2); 535(2); 207 (34); 69 (100)	4,12
Outros sinais				21,3

Fonte: Autor

Figura 11 – Espectros de massas e estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados por CG-EM em extrato de *Bixa orellana* após reação de derivatização.



Fonte: Autor

Segundo a metodologia proposta, foi realizada análise por microscopia de luz, onde os achados histológicos mais frequentemente observados foram analisados em conjunto para cada período considerado no experimento. Na descrição dos achados microscópicos, procurou-se ressaltar a comparação entre os grupos quanto à reparação óssea ocorrida no defeito ósseo.

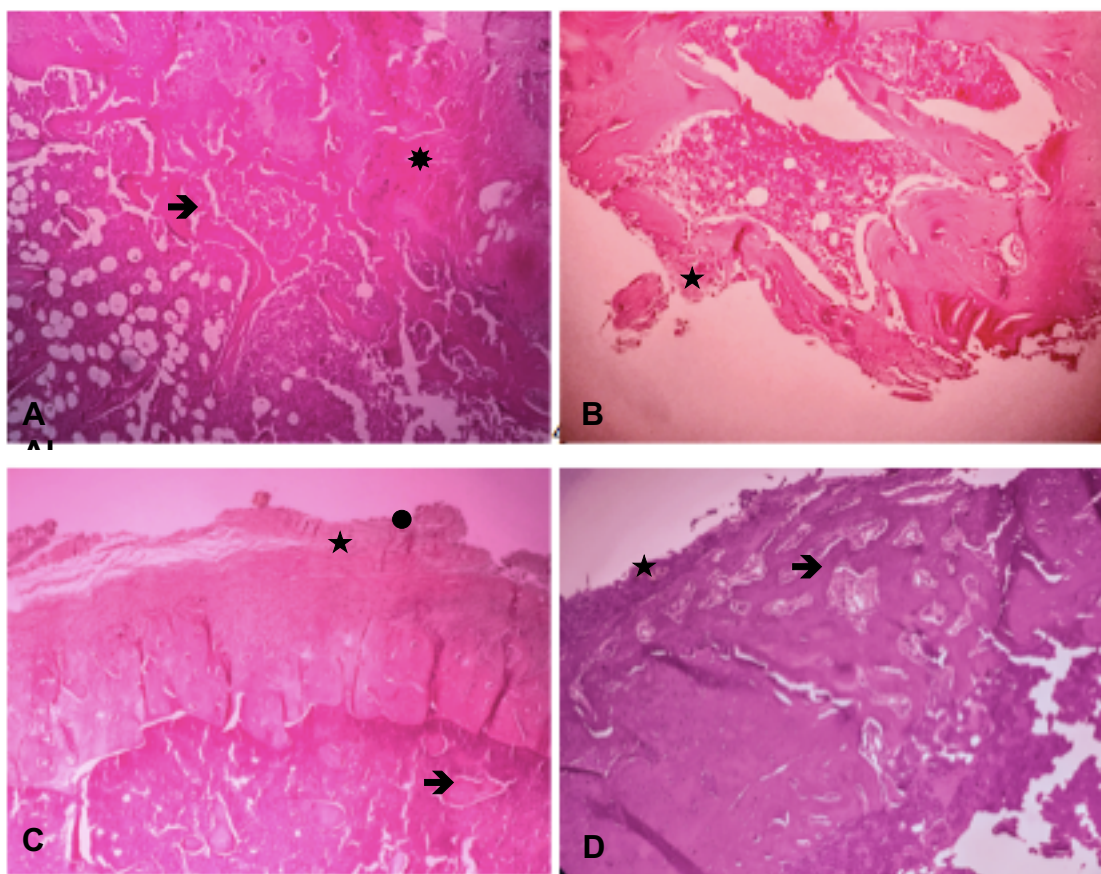
Nos cortes histológicos dos animais do grupo G1 eutanasiados após 14 dias, observou-se o fechamento linear dos defeitos ósseos com trabéculas ósseas imaturas, não lamelares e de distribuição irregular, presentes em grande quantidade no canal medular (Figura 12A).

No grupo G2, as áreas dos defeitos foram preenchidas por uma estreita faixa de tecido ósseo imaturo de espessura menor que da cortical, com poucas trabéculas ósseas e presença de um leve infiltrado inflamatório entre as trabéculas ósseas (Figura 12B).

Nos animais do grupo G3, a região dos defeitos ósseos apresentaram um fechamento linear da ferida com osso imaturo com algumas trabéculas ósseas no canal medular e uma evidente atividade osteogênica, principalmente, na região do perióstio próximo aos compostos do urucum, com ausência de infiltrado inflamatório (Figura 12C).

Quanto aos animais do grupo G4, os defeitos ósseos cirúrgicos foram preenchidos por osso imaturo na região central do defeito com trabéculas ósseas finas e entrelaçadas, com espaços medulares amplos e celularizados sendo revestido por osteoblastos e presença com um leve infiltrado inflamatório. Houve ainda proliferação celular com atividade osteogênica no perióstio ao redor do osso em formação (Figura 12D).

Figura 12– Fotomicrografia do reparo ósseo – 14 dias dos grupos G1 (A), G2 (B), G3 (C) e G4 (D). Aumento 100X; H.E. (→- trabécula óssea, *- inflamação, ●- compostos do urucum, ★- periósteo).



Fonte: Autor

Aos 30 dias pós-cirurgia, no G1 observou-se o fechamento linear dos defeitos experimentais com trabéculas ósseas imaturas, não lamelares e de distribuição irregular.

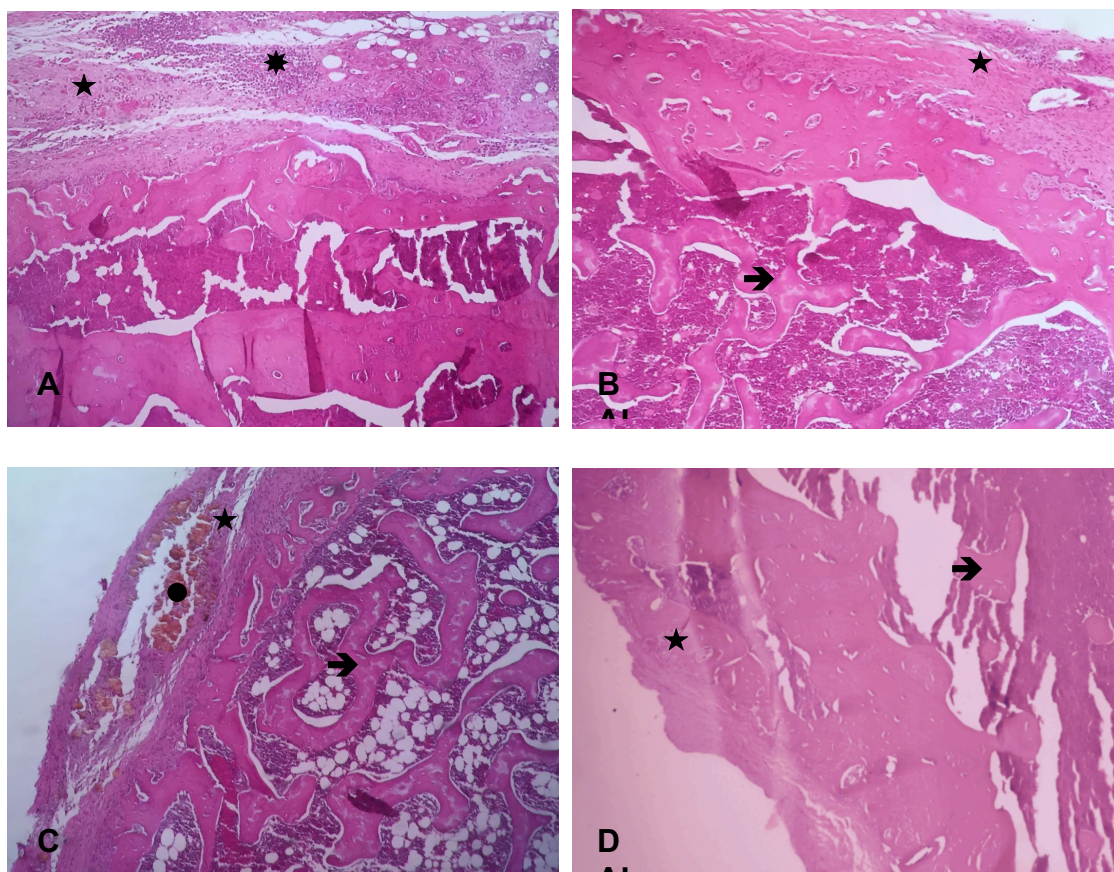
O tecido conjuntivo, correspondente ao periósteo em organização ou o resto de cicatriz cirúrgica sobre a área do defeito ósseo, apresentou-se com um grande número de células inflamatórias (Figura 13A).

Nos animais do G2, observou-se também fechamento linear dos defeitos experimentais, com a formação de ponte de tecido ósseo maduro e formação de trabeculado ósseo limitando áreas de tecido hematopoiético no interior do canal medular. Observa-se ainda na área correspondente, ao periósteo organizada com ausência de células inflamatórias e presença de células gigantes multinucleadas, indicativa de remodelação óssea (Figura 13B).

No corte histológico dos animais do G3, pode-se observar as margens do defeito com tecido ósseo maduro e formação de trabeculado ósseo limitando áreas de tecido hematopoiético no interior do canal medular; Intensa proliferação de células osteogênicas ao redor de compostos de urucum e na área correspondente ao periósteo com poucas células inflamatórias (Figura 13C). No G4, observou-se formação de ósseo maduro com trabeculado espesso e pequenas espículas ósseas dentro do tecido hematopoético no interior do canal do canal.

Envolvendo a área óssea neoformada, a camada de periósteo estava bem organizada com ausência de células inflamatórias (Figura 13D).

Figura 13 – Fotomicrografia do reparo ósseo – 30 dias dos grupos G1 (A), G2 (B), G3 (C) e G4 (D). Aumento 100X; H.E. (→)- trabécula óssea, * - inflamação, ● - compostos do urucum, ★ - periósteo).



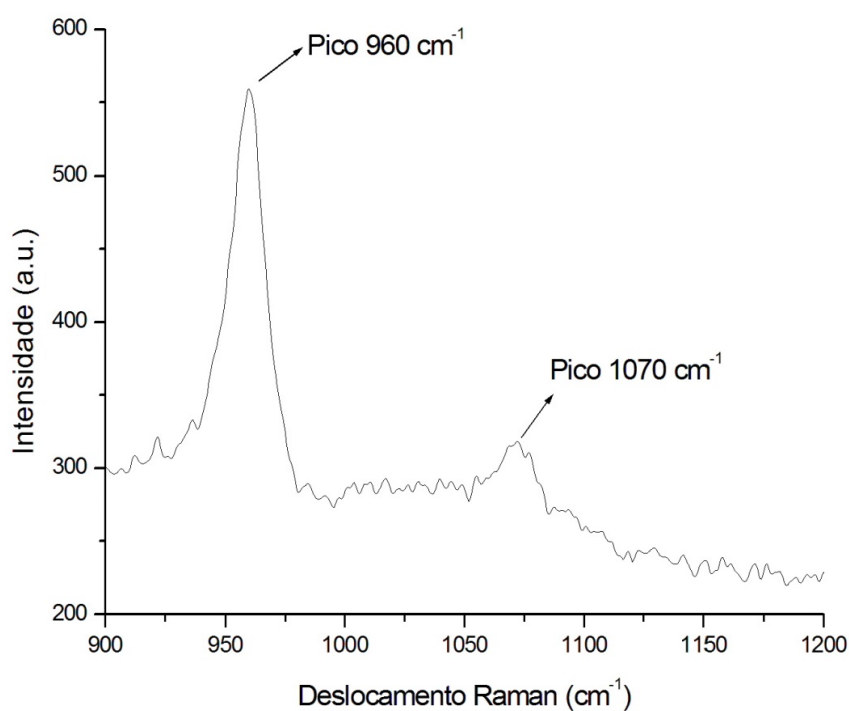
Fonte: Autor

No espectro Raman do osso, o pico localizado em 960 cm^{-1} corresponde diretamente com o teor/incorporação de Hidroxiapatita (HA), referente à vibração

molecular de fosfato primário (PO_4^{-3}), ou seja, quanto maior a intensidade deste pico, maior a concentração de hidroxiapatita, enquanto que o pico 1070 cm^{-1} corresponde ao carbonato (Figura 14).

Os resultados obtidos da razão entre as áreas dos picos Raman de 960 cm^{-1} e 1070 cm^{-1} na região cortical do defeito ósseo de todos os grupos e no período de 30 dias após os procedimentos cirúrgicos podem ser observados na Tabela 2.

Figura 14: Espectro Raman dos picos $\sim 960\text{ cm}^{-1}$ (fosfato) e $\sim 1070\text{ cm}^{-1}$ (carbonato).



Fonte: Autor

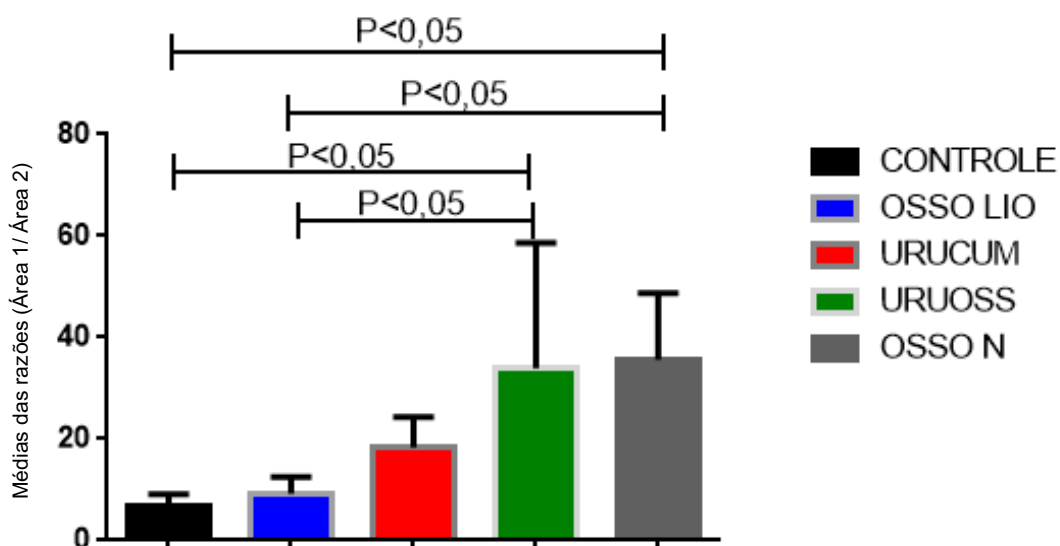
Tabela 2 – Valores das médias das áreas dos picos 960 cm⁻¹ e 1070 cm⁻¹ e da razão por grupo experimental com 30 dias após cirurgia.

	CONTROLE			OSSO LIOFILIZADO			URUCUM			URU/IOSS			OSSO NORMAL		
	Área 1	Área 2	RAZÃO	Área 1	Área 2	RAZÃO	Área 1	Área 2	RAZÃO	Área 1	Área 2	RAZÃO	Área 1	Área 2	RAZÃO
	Área 1	Pico 1070 cm-1	Área 1/ área2	Área 1	Pico 960 cm-1	Pico 1070 cm-1	Área 1/ área2	Área 1	Pico 960 cm-1	Pico 1070 cm-1	Área 1/ área2	Área 1	Pico 960 cm-2	Pico 1070 cm-1	Área 1/ área2
Rato 1	5206,54	1214,435	4,287	5393,685	988,758	5,455	3254,395	272,998	11,921	2923,206	43,827	66,698	9724,021	381,394	25,496
Rato 2	4845,81	530,925	9,127	3891,699	564,11	6,898	3567,523	262,579	13,587	1961,926	102,219	19,193	15591,687	480,676	32,437
Rato 3	4271,225	469,58	8,601	6552,948	539,221	12,152	4969,398	288,594	17,22	3282,163	283,519	11,58	30618,173	562,183	54,463
Rato 4	1957,215	252,8	7,742	2930,429	338,316	8,661	4090,4	153,435	26,659	3143,437	56,203	54,94	23141,620	536,468	43,137
Rato 5	1446,92	323,76	4,469	3962,005	302,593	13,093	2142,423	96,992	22,089	1175,661	65,531	17,94	7727,831	341,019	22,661

Fonte: Autor.

A análise estatística dos dados referentes ao teor de hidroxiapatita mostrou que houve diferença significativa entre os grupos aos 30 dias após cirurgia. Na comparação entre os grupos estudados, evidenciou-se diferença significativa entre os G4 e G1 ($p < 0,05$) e entre o grupo G4 e G2 ($p < 0,05$). Quando comparado o osso normal com os G2 e o G1 também evidencia-se diferenças significantes ($p < 0,05$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Médias \pm desvio-padrão das razões entre as áreas dos picos Raman de 960 cm^{-1} e 1070 cm^{-1} por grupo experimental com 30 dias após cirurgia.



Fonte: Autor

6 DISCUSSÃO

O modelo animal usado neste estudo tem sido utilizado em muitos experimentos que analisaram a influência de biomateriais para melhorar a regeneração óssea em defeitos ósseos na tíbias desses animais (PRADO *et al.*, 2006; SANTOS, 2006; ZIELAK *et al.*, 2017, MAIA *et al.*, 2014).

Foi evitado o uso de fêmeas devido à influência de fatores hormonais que poderiam interferir nos resultados obtidos, pois, segundo estudos feitos por Falonia e Cerri (2007) e Amadei *et al.* (2006), uma redução do nível de estrogênio diminui a atividade de osteoprotegerina (OPG) e aumenta a atividade de RANKL, aumentando assim a reabsorção e perda óssea.

De acordo com Garcia *et al.* (2012), a FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura periodicamente revisa os estudos publicados, visando manter constante a atualização sobre a inocuidade das substâncias utilizadas em alimentos. A organização reafirmou que os extratos de urucum não apresentam potencial tóxico, fato que confirma os achados de Alves de Lima, *et al.* (2003).

A bixina, ao ser saponificada, dá origem a um corante hidrossolúvel constituído pelo norbixina, que neste trabalho, foi obtido pela extração alcalina dos pigmentos das sementes de urucum por meio do KOH a 4%, fato que corrobora com os estudos de Rios e Mercadantes (2004) e Costa e Chaves (2005). Segundo Silva, Nachtigall e Stringheta (2009) e Nachtigall *et al.* (2009), quanto maior a concentração da base, maior a conversão de bixina em norbixina durante a reação de saponificação.

A análise por CG/EM mostrou a presença de norbixina, bixina e outros carotenóides nas sementes do urucum corroborando com os trabalhos de Tocchini e Mercadante (2001), Silvia (2007) e Nachtigall, *et al.* (2009) que apontaram tais compostos como majoritários.

Embora o uso do urucum como corante seja amplamente difundido devido às suas propriedades tintoriais, poucos são os relatos de seus efeitos biológicos no tecido ósseo, particularmente durante a reparação óssea. No entanto, em estudos realizados por Santos *et al.* (2014) e Capella *et al.* (2016) mostraram que, tanto o extrato oleoso quanto o extrato aquoso do urucum aceleraram o processo cicatricial por possuírem ação pró-inflamatória em feridas cutâneas de ratos devido, principalmente, aos constituintes carotenóides como a norbixina, bixina e ácidos graxos.

Na análise histológica dos grupos G3 e G4 foram observados, em ambos os períodos estudados, a presença de poucas células inflamatórias na área do defeito ósseo cirúrgico. Keong *et al.* (2011) e Yong *et al.* (2013) afirmam que a atividade anti-inflamatória dos compostos do urucum podem envolver um efeito inibitório do óxido nítrico. O óxido nítrico é um mediador inflamatório importante produzido pelo endotélio vascular e por macrófagos e está envolvido na supressão da permeabilidade vascular, diminuindo, portanto, o número de células inflamatória na região do defeito ósseo.

O estresse oxidativo causado pelos estágios iniciais da inflamação induz a uma superprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS) que dificulta o processo de reparo ósseo. A ação antioxidante da norbixina, constituinte majoritário no composto do urucum após saponificação, está relacionada segundo Somacal (2012) e Garcia *et al.* (2012), à sua excelente capacidade renovadora de espécies reativas, ou seja, devido a extensa cadeia de duplas ligações presentes na estrutura dos carotenóides, proporciona variações de distribuição eletrônica que permitem a adição de radicais livres aos carbonos adjacentes às insaturações, característica que proporciona maior reatividade dessas moléculas frente a agentes oxidantes, sobretudo derivados oxigenados.

Tal fato corrobora com os trabalhos de Lima *et al.* (2001); Moreira (2012); Santos *et al.* (2012) que demonstraram que os compostos do urucum têm sido apresentados como um agente protetor de células e tecidos contra os efeitos deletérios de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, diminuindo assim o processo inflamatório.

Houve uma intensa atividade de células osteogênicas do perióstio nos grupos G3 e G4 também em todos os períodos estudados, sugerindo a ação osteoindutora dos compostos do urucum nas lesões ósseas cirúrgicas. Estes dados estão de acordo com os trabalhos realizados por Park *et al.* (1997), Kin, Rao e Rao (2004), Nishide *et al.* (2015) e Yamaguchi (2012), os quais demonstraram que carotenóides têm um efeito estimulador direto na diferenciação dos osteoblastos através do aumento da atividade da fosfatase alcalina e da expressão do RNAm para osteopontina.

O osso bovino liofilizado utilizado neste experimento é um biomaterial aloplástico obtido da matéria-prima natural da estrutura óssea de bovinos, sendo biocompatível, constituído de cálcio e fósforo e que atua como um estimulador para neoformação óssea com propriedades osteocondutoras, como citado em ensaios clínicos em humanos por Nóia *et al.* (2014); Jayme *et al.* (2016). No entanto, o uso

isolado desse material neste trabalho não foi significativo, isso é devido à necessidade prévia de um tratamento antigênico, de deslipidização e desproteínização, que lhe reduz concomitantemente as suas capacidades osteoindutoras, servindo apenas de arcabouço para a neoformação óssea.

Quando comparados os resultados entre os grupos G4 e G1 e entre os grupos G4 e G2 na análise por Espectroscopia Raman, observou-se que houve significância ($p < 0,05$) em relação ao grupo G4, onde a mistura entre os compostos das sementes do ururum com o osso liofilizado mostraram ação tanto osteoindutora quanto osteocondutora durante o reparo ósseo, pois houve um aumento na incorporação de hidroxiapatita ao final do período de 30 dias comprovado pela espectroscopia Raman.

O aumento na incorporação de hidroxiapatita pode ser devido à ação dos carotenóides, que de acordo com Kin, Rao e Rao (2004) e Nishide *et al.* (2015) estimulam o aumento da atividade da fosfatase alcalina pelos osteoblastos, que está associada ao processo de mineralização da matriz óssea, pois promove hidrólise de fosfatos orgânicos, aumentando a concentração de íons fosfato que, juntamente com os íons cálcio presentes no meio circulante, forma o fosfato de cálcio.

O grupo G4 apresentou os melhores resultados no que diz respeito a razão entre as bandas dos picos $\sim 960 \text{ cm}^{-1}$ (fosfato) e $\sim 1070 \text{ cm}^{-1}$ (carbonato) que está relacionada com a proporção entre os componentes da matriz mineral, portanto quanto maior a razão, maior a incorporação de hidroxiapatita indicando uma maior maturidade óssea. Vários autores como Lopes *et al.* (2007), Teixeira *et al.* (2014), Mandair e Morris (2015), confirmaram que a técnica de espectroscopia Raman tem potencial na caracterização dos diferentes estágios de reparação óssea.

7 CONCLUSÕES

Nas condições apresentadas neste estudo, foi possível concluir que:

- 1) Os compostos majoritários das sementes do urucum são a norbixina, a bixina dentre outros caratonóides por CG-EM;
- 2) Os compostos das sementes do urucum aceleraram o processo de reparo ósseo provavelmente devido as suas ações pró-inflamatória e anti-oxidante;
- 3) A mistura de enxerto ósseo liofilizado/extrato seco contendo compostos das sementes do urucum pode ser utilizado como material osteocondutor e osteoindutor acelerando o processo de reparo ósseo.
- 4) A hidroxiapatita é melhor incorporada quando utiliza-se a mistura de enxerto ósseo liofilizado/ extrato seco contendo compostos das sementes do urucum.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K. *et al.* **Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

AFONSO, J.C. **Análise Química Quantitativa. Vogel. Livros Técnicos e Científicos**, 6ª Edição, 2002.

ALONSO, J. **Tratado de Fitofármacos y Nutracêuticos**. Rosário: Corpus, p. 41-45, 2004.

ALVES DE LIMA, R.O. *et al.* Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 2, p. 189-192, 2003.

ALVES, R. W. **Extração e Purificação de Corantes de Urucum**. Florianópolis, 2001. 158p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

AMADEI, S.U. *et al.* A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J Bras Patol Med Lab**. v. 42, n. 1, p. 5-12, 2006.

AMARAL, M. B. **Capacidade de regeneração óssea de biomateriais em defeito crítico de calvária: análise histológica e microtomografia computadorizada**. 2013 110f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos/ Instituto de Química de São Carlos/ Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

ANDIA, D.C., CERRIB, P.S., SPOLIDORIOC, L.C. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. **Revista de Odontologia da UNESP**. v. 35, n. 2, p. 191-98, 2006.

ANDRADE A.D.A. *et al.* Bone biology: the reviw of literatura. **Revista Implantnews**; v. 4, n. 6, p. 659-62, 2007.

ARAÚJO, K.S. **Efeito da terapia com LED operando em baixa potencia sobre a reparação óssea de ratos: análise por espectroscopia Raman**. 2009 70 f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba) - Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

BARBOSA, M. M. **Obtenção de carotenóides e flavonóides a partir do bagaço do pedúnculo do caju por maceração enzimática e prensagem.** 2010 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará, 2010.

BETTI, L.V. **Análises microscópica e radiográfica do reparo de defeitos confeccionados em fêmures de coelhos preenchidos com matriz óssea bovina medular em bloco ou cortical em microgrânulos.** 2004. 152f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Baurú, 2004.

BOHIC S, *et al.* Characterization of the trabecular rat bone mineral: effect of ovariectomy and bisphosphonate treatment. **Bone**, v. 26, p. 341–348, 2000.

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. 104-112, 2016.

CARDEN, A.; MORRIS, M.D. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). **J Biomed Opt.** v. 5, n. 3, p. 259-68, 2000.

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.

DANTASA, T. S. *et al.* Materiais de Enxerto Ósseo e suas Aplicações na Odontologia. **Cient Ciênc Biol Saúde**. v.13, n. 2, p. 131-5, 2011.

DAS, R.S.; AGRAWAL, Y.K. Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. **Vibrational Spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 163-176, 2011.

DEMCZUK Jr, B.; RIBANI, R.H. Atualidades sobre a química e a utilização do urucum (*Bixa orellana* L.). **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos** v. 6, n. 1, p. 37 - 50, 2015.

DINATO, J.C.; NUNES, L.S., SMIDT; R. Técnicas cirúrgicas para regeneração óssea viabilizando a instalação de implantes. In: Eduardo Saba-Chufji; Silvio Antonio dos Santos Pereira. (Org.). **Periodontologia: Integração e resultados.** São Paulo: Artes Médicas, p. 183-226, 2007.

DOOLEY, K.A. **Raman spectroscopic studies of bone biomechanical function and development in animal models**. 2011. Tese de Doutorado. The University of Michigan.

FALONI, A.P.S; CERRI, P.S. Cellular and molecular mechanisms of the estrogen in the bone resorption. **Rev Odontol UNESP.**, v. 36, n. 2, p. 181-188, 2007.

FERREIRA, C. **Caracterização por GC-MS de Glicídios Derivatização Assistida por Microondas**. 2011. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química Forense) - Universidade de Coimbra, 2011.

FRANCO, C.F.O; OLIVEIRA, T.T.; BARREIRO NETO, M. Ação dos corantes naturais de urucum no tratamento da hiperlipidemia em coelhos. **Tecnol. & Ciên. Agropec.** v. 7, p 51-54, 2013.

FRANCO, C.F.O. *et al.* **Etnobotânica e Taxonomia do Urucuzeiro**. 2008. Artigo em Hypertexto. In: 17º Seminário de Iniciação Científica e 1º Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. Disponível: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/UrucumTaxon/index.htm

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

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

GERSTENFELD, L. C. *et al.* Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Baltimore**, v.54, p.1215-1228, 2006.

GIULIANO, G.; ROSATI, C.; BRAMLEY P. M. -To Dye or Not to Dye: Biochemistry of Annatto Unveiled, **Trends in Biotechnology**, vol. 21, n.12 p. 513-516, 2003.

GLÓRIA, M.B.A. **Potencial de utilização do urucum**. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DO URUCUM, 2006, João Pessoa. Anais. João Pessoa: EMEPA, 2006. 1 CD_ROM.

GRANJEIRO, J. M. *et al.* Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n.10, p. 1463-1473, 2005

GUSMÃO, C. V. B.; BELANGERO, W. D. How do bone cells sense mechanical loading? **Rev Bras Ortop.**, v. 44, n. 4, p. 299-305, 2009.

GUTIERRES, M. *et al.* Substitutos ósseos: revisão. **Arq. Med.**, v.19, p.153-162, 2006.

JAYME, S.J. *et al.* Uso combinado de rhbmp-2, osso bovino particulado, tela de titânio, I-prf e incisão a distância para reconstrução óssea maxilar extensa. **INPerio**, v. 1, n. 3, p. 492-502, 2016.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KEONG, Y. Y. *et al.* Bixa orellana Leaves Extract Inhibits Bradykinin-Induced Inflammation through Suppression of Nitric Oxide Production. **Med Princ Pract**, v. 20, p.142–146, 2011.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

KIM, L., RAO, A. V., RAO, L. A G. Lycopene II—Effect on Osteoblasts: The Carotenoid Lycopene Stimulates Cell Proliferation and Alkaline Phosphatase Activity of SaOS-2. **Cells Journal of Medicinal Food.**, v. 6, n. 2, p. 79-86, July 2004.

KUMARI, P.; REDDY, C.R.K.; JHA, B. Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. *Anal. Biochem.*, v.415, p.134-144, 2011.

LIMA, J.L.O. **Análise comparativa entre o aloenxerto ósseo liofilizado, aloenxerto ósseo congelado e enxerto autógeno: estudo histológico em coelhos** [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia, 2013.

LIMA, L.R.P. *et al.* Bixin, norbixin and quercetin and lipid metabolism effects in rabbits. **Braz. J. Vet. Res. An. Sci.**, v.38, p.196-200, 2001.

LIMA, L.R.P. *et al.* Efeito de flavonóides e de corantes do urucum sobre a hiperlipidemia induzida em coelhos. **RBAC**, v. 42, n. 1, p. 69-74, 2010.

LIRANI, A.P.R. **Estudo comparativo dos efeitos do ultra-som e do laser de baixa intensidade no reparo ósseo de tibia de rato.** 2004. 109f. Dissertação (Mestrado)-Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

LOPES, C.B., *et al.* The effect of the association of NIR laser therapy BMPs, and guided bone regeneration on tibial fractures treated with wire osteosynthesis: Raman spectroscopy study. **J Photochem Photobiol B.**; v. 89, n. 2-3, p. 125-130, 2007.

MAIA FILHO, A.L.M.; *et al.* Evaluation of inorganic and organic bone components after application of an apatite-coated Al₂O₃ implants as scaffolds for bone repair. **Brazilian Archives of Biology and Technology** (Impresso), v. 57, p. 334-339, 2014.

MANDAIR G. S., MORRIS M. D., “Contributions of Raman spectroscopy to the understanding of bone strength,” **BoneKEy Rep.** v. 4, p. 620-625, 2015.

MANOHARAN, R.; WANG Y.; FELD, M.S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.** v. 52, n. 2, p. 215-249, 1996.

MASSONE, F. **Anestesiologia Veterinária.** 4.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

MONZOTE, L. *et al.* Antileishmanial Activity of the Essential Oil from Bixa Orellana. **Phytother. Res.**, v.28, p.753-758, 2014.

MORAIS, F. L. **Carotenóides: características biológicas e químicas.** 2006. 70 f. Monografia (Especialização em Qualidade em Alimentos)-Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

MOREIRA L.M, *et al.* Raman Spectroscopy: A Powerful technique for biochemical analysis and diagnosis, **Journal of Spectroscopy**, v. 22, n. 1, p. 1-19, 2008.

MOREIRA, V.S. **Atividade antioxidante e caracterização físico-química de variedades de urucueiros in natura e encapsulado.** 2013. 87 f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, 2013.

MOREIRA, P. R. **Atividade antioxidante da bixina sobre os danos causados pelo tetracloreto de carbono no fígado de ratos**. 2012. 45 f Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba, 2012.

MORRIS M. D., MANDAIR G. S., Raman assessment of bone quality. **Clin. Orthop. Relat. Res.** v. 469, n. 8, p. 2160–2169, 2011.

MOTA, N. L. *et al.* Embriologia e histofisiologia do tecido ósseo: revisão de literatura e bases histofisiológicas das principais doenças ósseas metabólicas. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27 , n. 1/2, p. 27-32, 2008.

MOVASAGHI, Z.; REHMAN, S.; REHMAN, I.U. Raman Spectroscopy of Biological Tissues. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, n. 5, p. 493- 541, 2007.

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

NARDUCCI, P.; BAREGG, R.I, NICOLIN, V. Receptor Activator for Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL) as an osteoimmune key regulator in bone physiology and pathology. **Acta Histochem**,v. 113, n. 2, p. 73-81, 2011.

NAUTH, A.; SCHEMITSCH, E. H. Stem cells for the repair and regeneration of bone. **Indian J. Orthop.**, v.46, n.1, p.19-21, 2012.

NISHIDE, Y *et al.* Combined Effects of Soy Isoflavones and β -Carotene on Osteoblast Differentiation. **Int J Environ Res Public Health**, v. 12 n. 11, p. 13750-13761. 2015.

NÓIA, C. F. *et al.* Associação entre osso autógeno e material heterógeno como forma de otimização de resultado em enxertia óssea: relato de caso. **Dental Pres Implantol.**, v. 8, n. 4, p. 50 -9, Oct-Dec, 2014.

PARK, C. *et al.* Vitamin A and Carotenoids Stimulate Differentiation of Mouse Osteoblastic Cells. **J Nutr Sci Vitaminol**, v.43, p. 281-296, 1997.

PEREIRA, C. C. S. *et al.* Técnica cirúrgica para obtenção de enxertos ósseos autógenos intrabucais em reconstruções maxilomandibulares. **Rev Bras Cir Craniomaxilofac.**; v. 15, n. 2, p. 83-9, 2012.

PRADO, F.A. *et al.* Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. **Rev. Odontol. Univ. São Paulo**, v.18, p.7-13, 2006.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. 2ª ed. Manaus: Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, p. 201-2005, 2001.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, p. 196, 2004.

RIOS, A.O.; MERCADANTE, A.Z. Novel method for the determination of added annatto colour in extruded corn snack products. **Food Additives and Contaminants**, v. 21, n. 2, p. 125-133, 2004.

ROEHRS, M. *et al.* Bixin and Norbixin Have Opposite Effects on Glycemia, Lipidemia, and Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Int J Endocrinol**. v. 2014, 2014.

RODRÍGUEZ-ÁVILA, N.L. *et al.* Identification and expression pattern of a new carotenoid cleavage dioxygenase gene member from *Bixa orellana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 15, p. 5385–5395, 2011.

RODRIGUEZ, R. *et al.* Respuesta tisular en defectos tratados con matriz ósea de origen bovino o humano. **Int. J. Morphol.**, v. 34, n. 1, p. 351-355, 2016.

ROSKAMP; V. VAZ, R.S., LIMA, J.H. C. Fatores imunológicos envolvidos na reabsorção de tecido duro na doença periodontal. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** v. 29, n. 6, 2006.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. **Histologia texto e atlas: em correlação com a biología celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

SANTANA, K.C. *et al.* Teores de bixina em urucum (*Bixa orellana*) “Piave Vermelha”, em diferentes acondicionamentos e temperaturas. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 1, p. 19-22, 2008.

SANTOS, G.C. *et al.* Protective effect of bixin on cisplatin-induced genotoxicity in PC12 cells. **Food Chem. Toxicol.**, v. 50, p. 335-340, 2012.

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. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.3, supl. I, p. 637-643, 2014.

SANTOS, I. M. P. **Regeneração óssea estimulada pela matriz dentinária alogênica em defeitos ósseos na tíbia de ratos (*Rattus norvegicus*), tratados pela técnica da regeneração óssea guiada.** 2006, 125 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade do Sagrado Coração, São Paulo, 2006.

SATYANARAYANA, A.; PRABHAKARA, P.G. R.; RAO, D.G. Chemistry, processing and toxicology of annatto (*Bixa orellana* L.). **Journal of Food Science and Technology**, v. 40, p. 131-141, 2003.

SKOOG, D.A.; WEST, D. M. HOLLER, F.J. **Fundamentos de Química Analítica.** Editora Thomson, 8ª Edição 889-945 (2000).

SILVA, P. I.; NACHTIGALL, A.M.; STRINGHETA, P.C. Fatores que influenciam a reação de saponificação dos carotenóides presentes no urucum (*Bixa orellana* L.). **Ciênc. agrotec.** [online]. v.33, p.1892-1897, 2009.

SILVA, P. I. **Métodos de extração e caracterização de bixina e norbixina em sementes de urucum (*Bixa orellana* L.).** Viçosa, 2007. 145 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa – UFV.

SOMACAL, S. **Efeito da norbixina sobre o estresse oxidativo, a resposta inflamatória e a aterosclerose em coelhos submetidos a uma dieta hipercolesterolêmica.** 2012, Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Maria.

SOUZA, R. A. *et al.* Raman spectroscopy study for measurement of bone compounds. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. 25, p. 249-256, 2008.

TAKAUTI, Y.C.A. *et al.* Assessment of Bone Healing in Rabbit Calvaria Grafted with Three Different Biomaterials. **Braz. Dent. J.** [online], vol. 25, n.5, p.379-384, 2014.

TEIXEIRA, A.P. *et al.* Confocal Raman spectroscopy: determination of natural moisturizing factor profile related to skin hydration. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica** (Impresso), v. 30, n. 1, p. 11-16, 2014.

TEN CATE, A .R. - **Histologia Bucal. Desenvolvimento, Estrutura e Função.** 7^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 2008.

TERA, T.M. *et al.* The RANK/ RANKL/ OPG interaction in the repair of autogenous bone grafts in female rats with estrogen deficiency. **Braz Oral Res.** v. 28, n. 1, p. 1-9, 2014.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A. Z. Extração e determinação, por CLAE, de bixina e norbixina em coloríficos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 3, p. 310-313, 2001.

UENOJO, M., MARÓSTICA JUNIOR, M. R., PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Quim. Nova**, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.

VILAR, D. A. **Estudo fitoquímico da bixina e fração oleosa extraídos da bixa orellana biomonitorado pela atividade leishmanicida.** 2015. 70 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

WANG, F. *et al.* β -Carotene suppresses osteoclastogenesis and bone resorption by suppressing NF- κ B signaling pathway. **Life Sciences.** v. 174, p. 15-20, 2017.

YAMAGUCHI, M. Role of carotenoid b-cryptoxanthin in bone homeostasis. **Journal of Biomedical Science.** v. 19, n. 36. 2012.<http://www.jbiomedsci.com/content/19/1/36>

YANG, L. *et al.* Biomimetic calcium phosphate coatings on recombinant spider silk fibres. **Biomed. Mater.**, v. 5, p.1-10, 2010.

YONG, Y. K. *et al.* Chemical constituents and antihistamine activity of Bixa orellana leaf extract. **BMC Complement Altern Med.** v. 14, p. 13-32, 2013.

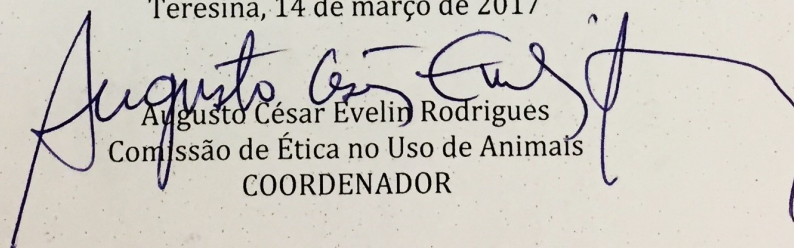
ZIELAK, J.C. *et al.* Histological evaluation of experimental bone grafting in vivo of lyophilized deproteinated bovine bone. **RSBO**, v. 4, n. 1, 2007.

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 norvegicus
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