

EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE AGRIÃO (*Nasturtium officinale* R. Br.) NA REPARAÇÃO ÓSSEA EM *Rattus norvegicus*

Esmeralda Maria Lustosa Barros¹, Waldilleny Ribeiro de Araújo Moura², Lianna Martha Soares Mendes³, Nayara Mara Santos Ibiapina⁴, Nayana Pinheiro Machado de Freitas Coelho⁴, Talvany Luis de Barros⁵, Cleânio da Luz Lima⁶, Nildomar Ribeiro Viana⁷, Alba Clara Vasconcelos Leopoldo Feitosa⁷ e Daniel Rocha Hüffel⁷

1. Universidade Federal do Piauí (UFPI), Programa Rede Nordeste de Biotecnologia, Teresina, Piauí, Brasil;
2. Universidade Federal do Piauí (UFPI), Departamento de Biofísica e Fisiologia, Teresina, Piauí, Brasil;
3. Universidade Federal do Piauí (UFPI), Departamento de Medicina Especializada, Teresina, Piauí, Brasil;
4. Universidade Estadual do Piauí (UESPI), Teresina, Piauí, Brasil;
5. Centro Universitário UniFacid, Teresina, Piauí, Brasil;
6. Universidade Federal do Piauí (UFPI), Departamento de Física, Teresina, Piauí, Brasil;
7. Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina, Piauí, Brasil;

RESUMO

Tem-se evidenciado estudos utilizando plantas medicinais na reparação óssea devido às suas composições fotoquímicas. O presente artigo teve como objetivo investigar o efeito do extrato do caule do agrião na atividade antiinflamatória e osteocondutora na reparação óssea em *Rattus norvegicus*. O extrato etanólico foi administrado por via oral e tópica na concentração de 5mg/kg. Foram utilizados 48 *Rattus norvegicus* divididos em 4 grupos com 12 animais, onde cada grupo foi subdividido de acordo como o tempo 15 e 30 dias, sendo: Agrião oral(G-I), Agrião tópico(G-II), preenchido tópico com de Bio oss® (G-III) e preenchido apenas com coágulo sanguíneo e solução salina (G-IV). Coletou-se ao final de cada experimento amostra sanguínea para dosagem de cálcio sérico e fosfatase alcalina. As tíbias com defeito ósseo e submetido aos tratamentos foram encaminhadas para análise histológica e Espectroscopia Raman. Os níveis séricos de cálcio no organismo após a administração do extrato etanólico de agrião por meio tópico e oral, durante 15 dias e 30 dias apresentaram uma melhor resposta quando comparados ao controle negativo. Na análise microscópica os grupos G-I e G-III apresentaram inflamação, sendo uma inflamação ativa com boa cicatrização. Já os grupos G-II e G-IV apresentaram melhor qualidade de osso neoformado aos 15 e 30 dias pós-cirúrgico. A análise Raman demonstrou que os grupos G-I e G-II apresentaram resultados semelhantes ao osso hígido, havendo fechamento parcial da lesão. Sendo assim, conclui-se que o extrato do caule do agrião *Nasturtium officinale* R.

Br. atua na neoformação óssea por apresentar uma atividade antiinflamatória e osteocundutora.

Palavras-chave: *Nasturtium officinale*, Teste Raman, Defeito ósseo e Inflamação.

ABSTRACT

Studies using medicinal plants in bone repair have been evidenced due to the medicinal plants photochemical compositions. This article aims to investigate the effect of watercress stem extract on anti-inflammatory and osteoconductive activity on bone repair in *Rattus norvegicus*. The ethanol extract was administered orally and topically at a concentration of 5mg/kg. This study used 48 *Rattus norvegicus* that were divided into 4 groups with 12 animals each. All the groups were also subdivided according to the time of treatment 15 or 30 days. Thus, the groups are identified as: oral watercress stem extract (G-I), topic watercress stem extract (G-II), topic padding with Bio oss® (G-III) and padding with blood clot and saline solution (G-IV). At the end of each treatment, blood samples were collected for serum calcium and alkaline phosphatase dosage. The tibias with bone defect which were submitted to treatments were referred for histological analysis and Raman Spectroscopy. The serum calcium levels in the body after administration of watercress stem ethanol extract through topical and oral means for 15 days and 30 days showed a better response when compared to the negative control group. In the microscopic analysis, groups G-I and G-III presented inflammation, being an active inflammation with good healing. In addition, the groups G-II and G-IV presented better quality of neoformed bone after 15 and 30 days post-surgery. The Raman analysis showed that groups G-I and G-II had as results a similar aspect to a healthy bone, with partial closure of the injury. Therefore, it is concluded that the extract of the stem of the watercress *Nasturtium officinale* R.Br. acts on bone neoformation by presenting an anti-inflammatory and osteocunductor activity.

Keywords: *Nasturtium officinale*, Raman Test, Bone Defect and Inflammation.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do planeta, possuindo uma vegetação muito diversificada com aproximadamente 46.096 espécies diferentes de plantas em mais de nove ecossistemas (DO BRASIL, 2015). As plantas e os produtos derivados têm sido utilizados ao longo da história para fins medicinais, onde, além do valor nutricional derivado de macro e micronutrientes, também contêm fitoquímicos (SAXENA et al., 2013; AUNG, 2017).

As plantas medicinais são matérias-primas para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. O fomento à pesquisa, ao desenvolvimento tecnológico e à inovação com base na biodiversidade brasileira e de acordo com as necessidades epidemiológicas da população, constitui importante estratégia para a Política Nacional de Plantas Medicinal e Fitoterápico (BRASIL, 2018).

Nas últimas décadas, a comunidade científica está se concentrando na validação de medicamentos à base de ervas e especiarias no desenvolvimento de novas drogas a partir desses arsenais terapêuticos naturais (BENZIE; WACHTEL-GALOR, 2011).

O termo "fitoquímico" refere-se aos compostos bioativos não-nutrientes presentes na dieta à base de plantas, fazendo parte do metabolismo secundário das plantas, nas quais, são responsáveis por manter as funções cruciais para a sobrevivência e aptidão reprodutiva (GONZÁLEZ-VALLINAS et al., 2013). Atualmente, estão sendo classificados de acordo com a origem biossintética dos metabólitos secundários, compreendendo três grupos os polifenóis, terpenóides e alcalóides, que contribuem para as propriedades medicinais das plantas (KAUR et al., 2018).

Muitas plantas são popularmente utilizadas para fins nutricionais ou terapêuticos e, no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos para o tratamento de doenças degenerativas como a osteoartrite. Há necessidade de evidências científicas para validação de espécies de plantas, como as realizadas o *Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae), popularmente utilizado devido as suas capacidades diuréticas, antiinflamatórias e cicatrizantes (KUMAR, et. al. 2007).

As práticas médicas populares recorrem aos elementos naturais disponíveis nas comunidades, onde, na maioria das situações são, os únicos disponíveis (LEITE et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2010; ROQUE et al., 2010). Estudos mostram que vários produtos naturais têm a capacidade de favorecer o processo de reparação óssea (BLOKHUIS; ARTS, 2011; MARAO et al., 2011; SANTOS et al., 2014; GARCIA-GARETA et al., 2015).

O estudo justifica-se devido a necessidade de uma abordagem terapêutica com a utilização do agrião (*Nasturtium officinale* R. Br) para a investigação de seu uso na ação antiinflamatória e osteocondutor na regeneração óssea em *Rattus norvegicus*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

Neste estudo foram aplicados os princípios éticos da experimentação animal em conformidade as diretrizes do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) conforme Resolução Normativa Nº 37 de 15 de fevereiro de 2018, sendo submetido

e aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animal (CEAU/UFPI) conforme registro nº. 520/18.

2.2 ANIMAIS

O experimento foi realizado com 48 roedores da espécie *Rattus norvegicus*, da raça wister, fêmeas com idade de 60 dias e peso entre 250 a 300 gramas, clinicamente saudáveis, proveniente do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI) mantidos em ambientes higienizados, em gaiolas de polipropileno desde o nascimento, alimentados com dieta padrão do biotério ração (Labina TM) e água 'ad libitum' (a vontade) com ciclo de claro e escuro de 12 horas, em temperatura ambiente entre 20° a 24°C. Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos com 12 animais, onde cada grupo foi subdividido em 2 subgrupos de acordo com o período de eutanásias 15° e 30° dia pós cirúrgicos.

2.3 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Os caules do *Nasturtium officinale* R. Br. (agrião) foram adquiridos numa rede de supermercado de Teresina-PI no início do mês agosto de 2018. Os caules foram higienizados e retiradas as folhas, sendo em seguida colocadas para secar em temperatura ambiente em um local arejado e na sombra por 15 dias para obter a desidratação, após o qual os caules foram submetidas ao processo de moagem, em liquidificador industrial (METVISA–26FEV14), no laboratório de fisiologia da UFPI de Teresina Piauí. Foram obtidos 200 g um pó de coloração esverdeada, e adicionado 500 ml de álcool etílico absoluto para extração dos compostos químicos. A mistura obtida foi agitada manualmente por cinco minutos com frequência durante 7 dias, procedendo-se depois com a filtração e logo após, o extrato etanólico concentrado foi colocado em evaporador rotativo (IKA RV-10) sob pressão reduzida e temperatura controlada (50°C – 55°C). Parte do extrato foi submetida a um processo de liofilização, em temperatura variável de 50°C a 20°C obtendo-se o liofilizado um extrato etanólico graxoso dos caules. O extrato foi armazenado em um frasco âmbar e conservado em geladeira até o momento do uso.

2.4 INDUÇÕES DO DEFEITO ÓSSEO

Para a realização do processo cirúrgico todos os animais foram pesados e submetidos a anestesia dissociativa com cloridrato de quetamina (50 mg/mL) (Dopalen®, Sespo Indústrias e Comércio Ltda, Paulínia, SP, Brazil) e Xilazina (20 mg/mL) (Anasedan®, Sespo Indústrias e Comércio Ltda, Paulínia, SP, Brasil) na proporção de 1:1 (0,1ml – 100g) via intramuscular na região da pata esquerda traseira (MASSONE, 2008). Em seguida, foi realizada a tricotomia da pele (medial dos membros pélvicos direito) e realizada a assepsia com a solução de iodo povidine tópico (Ceras Johnson® Ltda, Manaus, AM, Brasil) mantidos permanentemente na posição supino. A área aonde foi realizada a cirurgia foi isolada com campos cirúrgicos estéril em seguida sendo realizado uma incisão linear de 20 mm de extensão, no sentido crânio – caudal, com bisturi nº 15, seguida da divulsão da pele, músculo e perióstio para a exposição da superfície óssea medial, com preservação do perióstio.

Com uma broca esférica calibre Nº 08 montada em um micromotor cirúrgico com abundante irrigação com soro fisiológico 0,9% foi realizado um defeito ósseo na região da metáfise tíbia direita de 2 mm de diâmetro, de forma monocortical de profundidade até atingir o canal medula. Finalizando, o tecido muscular foi aproximado com a sutura simples com o fio agulhado de Nylon nº 0.4.

Para terapia antimicrobiana, todos os animais receberam nos pós-cirúrgico uma dose única (0,02 ml /100 g) de Pentabiótico (Fort Dodge®) de amplo-espectro, via intramuscular profunda. Para terapia analgésica no pós-operatório foi administrada via oral Dipirona Sódica 0,03 ml/ 100 g de a cada 12 horas durante os dois primeiros dias

2.5 TRATAMENTO

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos com 12 animais, onde cada grupo foi dividido em 2 subgrupos de acordo com o período em que os animais foram eutanasiados (15º e 30º dia pós cirúrgicos). Os grupos foram divididos em: Grupo I - Neste grupo experimental foi confeccionado um defeito ósseo na tíbia e preenchido com extrato seco de *Nasturtium officinale R.Br* (agrião); Grupo II- Confeção do defeito ósseo na tíbia e administração por gavagem do extrato de *Nasturtium officinale R.Br*. (agrião) na concentração de 5mg/kg; Grupo III- Grupo controle positivo em que foi confeccionado um defeito ósseo na tíbia ao final do procedimento sendo preenchido com Bio oss® e Grupo IV

- Grupo controle negativo sendo que confeccionado um defeito ósseo na tíbia com preenchimento apenas com solução salina e coágulo sanguíneo

2.6 ANÁLISE BIOQUÍMICA

Para a avaliação do metabolismo ósseo foi mensurado os níveis de fosfatase alcalina e cálcio, marcadores de formação óssea específicos, que foram realizadas após término da aplicação do protocolo experimental, obedecendo aos tempos de tratamento do estudo de 15 e 30 dias.

Após um jejum de 8h os animais foram anestesiados com anestesia dissociativa cloridrato de quetamina, dose de 50 mg/mL (Dopalen®, Sespo Indústrias e Comércio Ltda, Paulínia, SP, Brasil) e xilazina, na dose de 20 mg/mL (Anasedan®, Sespo Indústrias e Comércio Ltda, Paulínia, SP, Brasil), via intramuscular na região da pata esquerda traseira (MASSONE, 2008).

A seguir foi realizada a punção cardíaca em cada animal, onde coletou-se entre 3 a 5 ml de sangue que foram armazenados em tubos (Vacuete Serum Sep Clot Ativador Capacidade 5 ml). As amostras foram centrifugadas a 2.500 (RPM) rotação por 10 minutos em centrífuga de bancada Excelsa II Modelo 206 BL. para obtenção do soro. As análises foram realizadas através do método colorimétrico por meio do Kit Labtest (Minas Gerais, Brasil). Após terem sido acondicionadas em freezer -40°C onde permaneceram por três dias. As amostras foram conduzidas por meio de uma parceria firmada com o Laboratório do Hospital Universitário Veterinário da Universidade Federal do Piauí – HUV.

2.7 EUTANÁSIA

Após o período de 15 e 30 dias da cirurgia os animais foram eutanasiados de acordo com os princípios éticos adequados (CONCEA, 2018) para a dissecação das amostras que foram submetidas à análise. Os animais receberam via peritoneal anestésico lidocaína 10 mg/kg seguida por um barbitúrico (pentobarbital sódico 100 mg/kg via intraperitoneal Tiopentax®, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos, Itapira, SP, Brasil). Os órgãos fígado, rins e estômago foram retirados e colocados em frascos de formol tamponado a 10%. As tíbias contendo os defeitos ósseos foram desarticuladas cirurgicamente e mantidas em nitrogênio líquido a -196°C até a realização dos testes Raman. Após o teste foram fixadas em formol tamponado a 10% por no mínimo 48h e descalcificadas em solução de ácido

fórmico 20%. As peças foram encaminhadas ao processo laboratorial de rotina para análise histológica. Este procedimento seguiu os princípios éticos e adequados (CEUA). Quanto às carcaças dos cadáveres dos animais que foram usados no estudo estas foram acondicionadas em saco branco com o símbolo de risco infectantes, colocadas em freezer, e posteriormente foi entregue a empresa especializada em destinação de resíduos de serviços de saúde para o descarte apropriado.

2.8 ESPECTROSCOPIA RAMAN

As tíbias dissecadas dos animais eutanasiados após o período de tratamento foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) pois, é o recomendável para a espectroscopia Raman. Para iniciar a obtenção dos espectros Raman, as amostras foram descongeladas em solução fisiológica a 0,9% (COELHO, et al., 2014; MAIA FILHO, et al., 2014).

As análises Raman foram realizadas usando um espectrômetro micro-Raman Senterra Bruker, localizado no laboratório de Física dos Materiais- FISMAT do programa de pós-graduação em Física da UFPI. Como fonte de excitação um laser com $\lambda = 785\text{ nm}$. A fenda do espectrômetro foi ajustada para uma resolução de 4 cm^{-1} . Um microscópio óptico Olympus (Olympus BX-50) com objetiva Olympus MPlan 10x/0.25NA foi utilizado para focar a superfície das amostras e obter as imagens, como também os espectros Raman. Os espectros foram obtidos na região espectral de $100\text{ a }1500\text{ cm}^{-1}$, com 3 acumulações de 20s.

2.9 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Após a eutanásia dos animais, a tíbia contendo os defeitos ósseos foi removida cirurgicamente, sendo armazenadas em nitrogênio líquido a (-196°C) até a realização do teste Raman. Em seguida foram fixadas em formol tamponado a 10% por 48 h e após esses período foram colocadas em uma solução descalcificadas em formalina 25% e encaminhadas para os procedimentos histológico de rotina para inclusão em blocos de parafina onde cada peça passou por um corte longitudinais em espessura de 5 um em micrótomo rotativo, resultando em cortes semicerrados da região de interesse e submetido a coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram avaliadas através de microscopia de luz. A análise descritiva histológica foi baseada nos critérios de presença de infiltrado inflamatório, necrose, formação de fibrose, neoformação óssea (tecido ósseo imaturo e lamelar) e fibras de colágeno.

As análises das lâminas foram realizadas em microscópio óptico Olympus com uma objetiva de 5X. Para a captura das imagens usou-se uma câmara Samsung SDC-415 e programa Image Capture para captura de imagens que fica acoplada ao microscópio trinocular Nikon eclipse E200 a um computador, do Laboratório de Patologia do Hospital Universitário (HU), produzindo um aumento similar a uma objetiva de 100X e 40X o que possibilitou uma melhor interpretação das imagens. Cada imagem foi capturada sob luz normal e luz polarizada, para posterior diferenciação e quantificação da área com a presença de colágeno. Foram selecionados dois campos por lâmina representando toda a área da lesão. Para cada área da lesão foi eleita, na mesma lâmina, uma região adjacente ao defeito com dimensões semelhantes, representando o osso normal (100% de neoformação óssea).

2.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram avaliados utilizando o programa Graphpad Prism versão 5.0, software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) para aplicação do teste de análises de variância One – Way ANOVA post hoc Tukey considerando o nível de significância de 95% ($p < 0,05$) para comparações múltiplas entre os grupos tratados e os grupos controles.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.1.1 Cálcio Sérico

Na figura 1 estão apresentadas as concentrações séricas de cálcio após 15 dias de experimentação tópica dos extratos etanólicos de agrião. Esses dados demonstram que a concentração sérica de cálcio é significativamente menor ($p < 0,05$) no grupo tratado com extrato etanólico de agrião quando comparada ao grupo controle negativo (solução salina células sanguíneas). O grupo tratado com extrato etanólico do matruz tópico não apresentou diferença estatisticamente significativo nos níveis de cálcio sérico em comparação aos controles negativos e positivos. Tal fato pode ser explicado, provavelmente devido ao breve período de tempo para o organismo começar a elevar de forma sérica seus níveis de cálcio.

Observa-se que não temos uma diferença estatística na concentração sistêmica do cálcio entre os grupos, o que levamos ao entendimento que o grau de absorção do mesmo,

não é influenciado pela administração tópica ou período de tempo (15 dias) de tratamento avaliado.

De modo semelhante ao tratamento tópico, a administração do extrato etanólico de agrião por via oral produz concentrações séricas de cálcio significativamente menores ($p < 0,05$) quando comparada ao grupo controle negativo (salina), sem diferenças significativas entre os demais grupos.

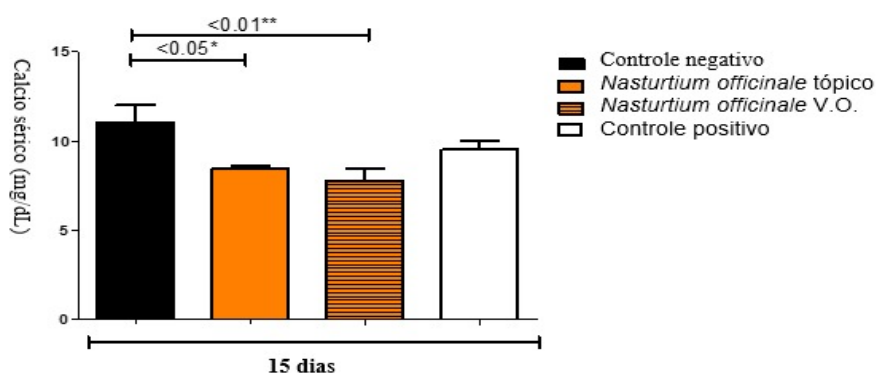


Figura 1. Dosagens séricas de cálcio (mg/dL) após 15 dias de realização de defeito ósseo na tíbia de ratos Wistar. Os animais foram tratados com extratos etanólicos tópicos e oral de agrião 5mg/kg, solução salina e osso sintético (Bio oss®). ^a $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle solução salina e células sanguíneas (ANOVA one-way/ Tukey).

A dosagem sérica de cálcio foi empregada neste trabalho com o objetivo de avaliar o comportamento do metabolismo do íon Ca^{2+} nos organismos dos animais ao utilizar os extratos de agrião.

Para o cálcio manter seu controle da homeostasia no corpo é necessário envolver os processos de absorção, excreção, secreção e armazenamento no osso, e deve-se manter a concentração do cálcio ionizado no plasma dentro de uma escala de 2,1 - 2,3mM (CASHMAN, 2002), onde o paratormônio (PTH) é o principal regulador. Este estimula a transferência de cálcio do osso para o sangue, reduzindo a reabsorção tubular renal de cálcio e estimulando indiretamente sua absorção intestinal através da forma hormonal de vitamina D-1, 25(OH)2D3.

A dosagem de cálcio total no soro usualmente é feita por métodos colorimétricos, hoje automatizados e bastante confiáveis, sendo o método de referência o baseado em absorção atômica. Diversas equações foram advogadas para a correção dos valores do cálcio total no que se refere a alterações do conteúdo protéico, sendo a mais usada a proposta por (MCLEAN; HASTINGS, 1935).

Na figura 2 quando avaliados os efeitos dos tratamentos sobre níveis séricos de cálcio após o período de 30 dias de administração oral, não se observou que houve diferença significativa entre os grupos.

Contudo, quando analisados os dados dos aos níveis séricos de cálcio após administração tópica por 30 dias, observa-se redução significativa desse parâmetro ($P < 0,05$) em relação aos grupos controles negativos e positivos quando tratado com extrato etanólico de agrião. É importante destacar que o cálcio sérico circula sob duas formas principais: cálcio ionizado (que exerce ação biológica) e cálcio ligado a proteínas e complexado; o primeiro corresponde, em circunstâncias normais, a 52% do total e o segundo, a 48%. Considerando isso, em uma série de circunstâncias clínicas, entre elas o processo de regeneração óssea, a dosagem de cálcio total isoladamente não pode ser considerada fator determinante para conhecimento da calcemia funcional (VIEIRA, 2007).

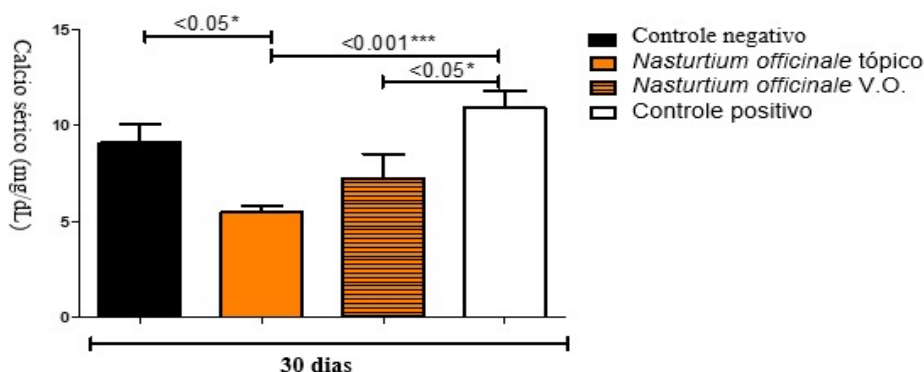


Figura 2. Dosagens séricas de cálcio (mg/dL) após 30 dias de realização de defeito ósseo na tíbia de ratos Wistar. Os animais foram tratados com extratos etanólicos tópicos e orais de agrião de 5mg/kg, solução salina e sintético (Bio oss®). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (ANOVA one-way/ Tukey).

3.1.2 Fosfatase alcalina sérica

Com relação aos tratamentos tópicos, o uso do osso sintético por período de 15 dias produziu redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos níveis séricos de fosfatase alcalina quando comparados aos grupos salina, extrato etanólico de agrião, mas sem diferença em relação ao grupo controle salina (Figura 3). Esses dados sugerem que ambos os extratos quando utilizados por via tópica por 15 dias não produzem alterações nos níveis séricos de fosfatase alcalina.

Os tratamentos com os extratos por via oral durante 15 dias, por sua vez, não produziram diferenças estatísticas significativas nos níveis séricos de fosfatase alcalina em relação ao controle negativo (Solução salina e células sanguíneas). O grupo tratado com extrato etanólico de agrião apresentou níveis séricos de fosfatase alcalina estatisticamente menor quando comparado ao grupo osso sintético (Figura 3).

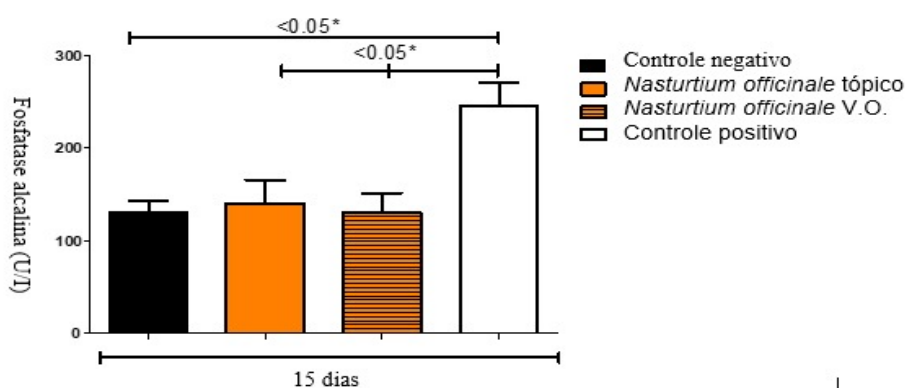


Figura 3. Fosfatase alcalina sérica (U/L) após 15 dias de realização de defeito ósseo na tíbia de ratos Wistar. Os animais foram tratados por via oral com extratos etanólicos de agrião 5mg/kg, solução salina e osso sintético (Bio oss®). ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo osso sintético (ANOVA one-way/ Tukey).

Os níveis de fosfatase alcalina nos animais após 30 dias de tratamento com Bio osso® ($p < 0,05$) mostraram-se superiores ao controle negativo. A continuidade do tratamento com os extratos etanólicos do mastruz e do agrião por via tópica não alterou os níveis séricos de fosfatase alcalina quando comparado ao grupo controle positivo (osso sintético), contudo o grupo tratado com extrato etanólico de agrião apresentou níveis da enzima estatisticamente inferiores ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo (solução salina, células sanguíneas) (Figura 4).

Quanto ao tratamento oral, também foi observado nível sérico de fosfatase alcalina significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo tratado com osso sintético quando comparado aos demais grupos. Os animais tratados com extrato etanólico de agrião apresentaram nível sérico de fosfatase alcalina significativamente maior ($p < 0,05$), mas, sem diferença significativa em relação ao grupo controle negativo (Figura 4). Dessa forma, os extratos etanólicos de agrião utilizados por via tópica e oral por 30 dias parece não produzir alterações nos níveis séricos de fosfatase alcalina.

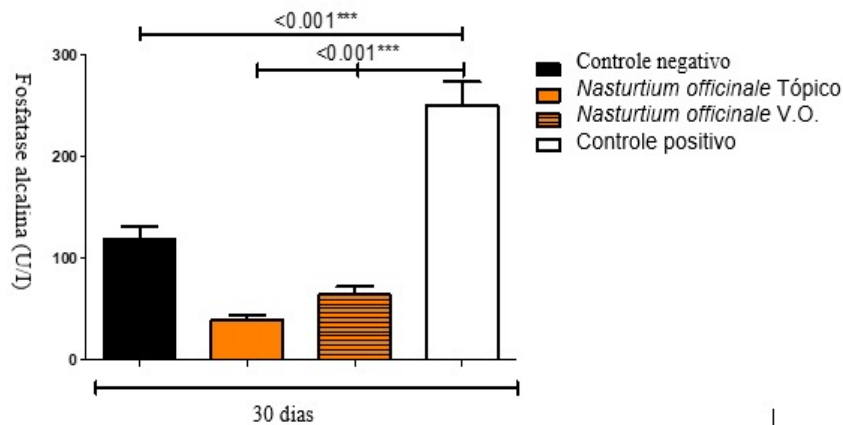


Figura 4. Fosfatase alcalina sérica (U/L) após 30 dias de realização de defeito ósseo na tíbia de ratos Wistar. Os animais foram tratados por via tópica e oral com extrato etanólicos de agrião 5mg/kg, solução salina e osso sintético (Bio oss®). ^a $p < 0,05$ em relação ao grupo osso sintético (ANOVA one-way/ Tukey).

Os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo podem ser definidos como substâncias que retratam a formação ou a reabsorção óssea. Durante a formação do osso, a produção da matriz colágena precede a mineralização e a fase de produção de matriz colágena coincide com uma maior produção de fosfatase alcalina, sendo dependente da ação dos osteoblastos (SARAIVA; LAZARETTI-CASTRO, 2002).

Desta forma, pode-se dizer que a dosagem sérica da fosfatase alcalina pode oferecer subsídios importantes para compreensão do metabolismo ósseo, uma vez que durante o processo de mineralização seus níveis séricos encontram-se elevados, indicando aumento da atividade osteoformativa (VIEIRA, 2007).

A mensuração da concentração sanguínea da fosfatase alcalina teve a finalidade precípua de auxiliar na avaliação da taxa de formação óssea. Como as isoenzimas da fosfatase alcalina osso-específica estão localizadas na membrana plasmática do osteoblasto, grandes quantidades podem ser secretadas quando a matriz óssea se encontra ativa. Além disso, a mesma pode difundir-se pelo sangue na forma de um dímero (GUYTON; HALL, 2017) e a concentração sanguínea é considerada um bom indicador da taxa de formação óssea, justificando a metodologia empregada.

Embora a atividade da fosfatase alcalina não tenha sido completamente elucidada, a metodologia empregada no presente estudo demonstrou que ocorreram variações substanciais nos níveis séricos.

3.2 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Com relação ao grupo experimental onde, utilizou o extrato etanólico de forma tópica com agrião grupo-I (Figura 5- A), tratados por 15 dias notou-se uma inflamação ativa e uma cicatrização imatura. Já nos animais onde administrou-se agrião por via oral grupo-II (Figura 5-B) foi possível observar a ausência de inflamação ativa, observou-se a presença de tecido ósseo já organizado próximo da normalidade.

Como já previsto a tíbias dos animais tratados com osso sintético Bio oss® ou seja, controle positivo grupo- III (Figura 5- C) por ser um material já aprovado no mercado, apresentou ausência de inflamação e cicatrização eficaz. O grupo IV- controle negativo onde foi preenchido apenas com o coágulo sanguíneo (Figura 5- D) constatou-se a presença de necrose com infiltrado inflamatório.

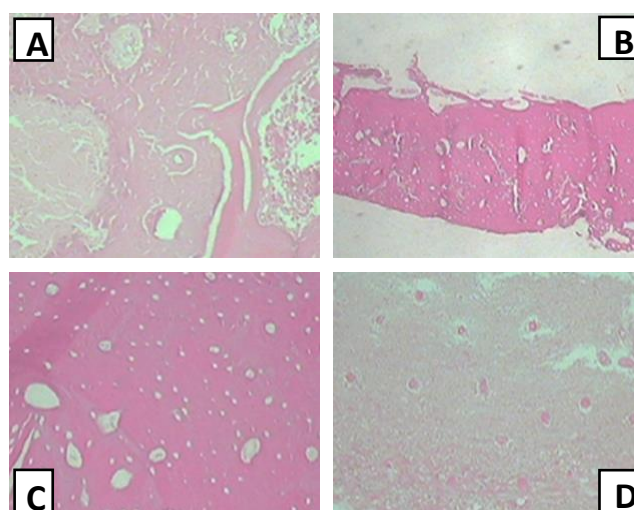


Figura 5. Fotomicrografia do reparo ósseo dos grupos experimentais aos 30 dias pós-operatórios. (A) Tratado com agrião tópico. Aumento 100x H.E. (B) Tratado com agrião oral. Aumento 40 X H.E. (C) Tratado com Bio osso®. Aumento 100x H.E. (D) Sem tratamento. Aumento 40 X H.(E).

Neste estudo utilizou-se nos animais de controle positivo um osso sintético (Bio oss®). Estes enxertos ósseos podem atuar por meio de três diferentes mecanismos: osteogênese, que se refere ao material orgânico capaz de atuar na formação óssea diretamente a partir dos osteoblastos; osteoindução, em que todo material é capaz de induzir à transformação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ou condroblastos, aumentando, assim, o crescimento ou podendo formar osso onde não é esperado e osteocondução, que vem a ocorrer quando um material, frequentemente inorgânico, permite aposição óssea

sobre osso preexistente, requerendo a presença de osso e células mesenquimais diferenciadas (SERVICE, 2000).

Após análise da Fotomicrografia do extrato etanólico do agrião em defeito osseo causou uma redução significativa na área da quando comparada com o grupo controle. O que reforça o uso do agrião como tratamento terapêutico em processos cicatrizantes e antiinflamatórios.

Estudos evidenciam os efeitos anti-inflamatórios da administração tanto sistêmica como tópica do extrato hidroalcoólico do agrião nas concentrações de 500 a 750 mg/kg foi significativo comparado com a com indometacina (10 mg/kg) em animais experimentais nas atividades anti-inflamatórias (SADEGHI et al., 2013).

3.3. ESPECTROSCOPIA RAMAN

Para todas as amostras as análises Raman foram realizadas em duas regiões diferentes, dentro e fora da lesão. As análises foram realizadas em triplicatas e para cada amostra foram coletados 5 espectros fora e 5 dentro da lesão. As amostras foram separadas em 4 grupos de acordo com tipo de tratamento pré definido.

As análises realizadas fora da lesão são para mostrar o espectro característico do osso, mas principalmente do pico em $\sim 967\text{cm}^{-1}$ pico este referente ao grupo fosfato (PO_4)³⁻ e compara-lo com os espectros obtidos dentro da lesão para verificar a regeneração óssea, ou seja, quando houver a regeneração este pico (em $\sim 967^{-1}$) deve ser observada e suas correspondentes intensidade e área em comparação com o de referência (espectro obtido fora da lesão) mostra o quão rápido está sendo esta regeneração devido a formação do grupo fosfato.

Nas análises qualitativas do Teste podem-se observar os espectros na Figura 6(a) com 15 dias e em 6(b) com 30 dias após a lesão. Observe os gráficos das Figuras 6(a) e 6(b) (amostras sem qualquer tratamento, grupo IV). Nos gráficos P1 temos o pico característico da formação óssea (967 cm^{-1}), o que não é observado nos espectros do ponto P2 (espectros na lesão) com a mesma intensidade. O que nos garante que neste período de tempo não ocorreu à formação óssea completa.

Quando observamos os espectros da figura 6(c) e 6(d) (grupo III: grupo que receberam o tratamento de reposição óssea). Para estas amostras observamos o aparecimento do pico da formação óssea na região da lesão (P2). Observe que o gráfico P2 da Figura 6(c) que o pico é menos intenso que o P2 da Figura 6(d), que é da mesma ordem da intensidade que o

pico obtido fora da lesão. A imagem da Figura 6(c) mostra que a lesão está praticamente fechada e, a imagem da figura (d) está completamente fechada. Isso já é esperado devido o tratamento ser reposição óssea. Estes resultados dos grupos III e IV servirão como parâmetros de avaliação dos demais tratamentos. Os resultados para 15 e 30 dias são apresentados nas Figuras 6(e) e 6(f) para o grupo I, grupo tratado com agrião-tópico e nas Figuras 6(g) e 6(h) para o grupo II, grupo tratado com agrião oral para 15 e 30 dias, respectivamente. Quando avaliamos os espectros desses grupos observamos que os espectros na lesão (P2) para o grupo I apresentam o pico característico da formação óssea (pico em 967 cm^{-1}). As intensidades destes picos (gráficos P2) tanto para 15 dias (Figura 7e) como para 30 dias (Figura 6f) têm intensidade da ordem de 2/3 da intensidade dos picos obtidos fora da lesão, enquanto para o grupo II a intensidade se aproximando de 2/3 da intensidade dos picos obtidos fora da lesão.

Os resultados para os grupos I 30 dias e grupo II são similares entre si, mas os resultados do grupo II só não são mais significativos que dos grupos III.

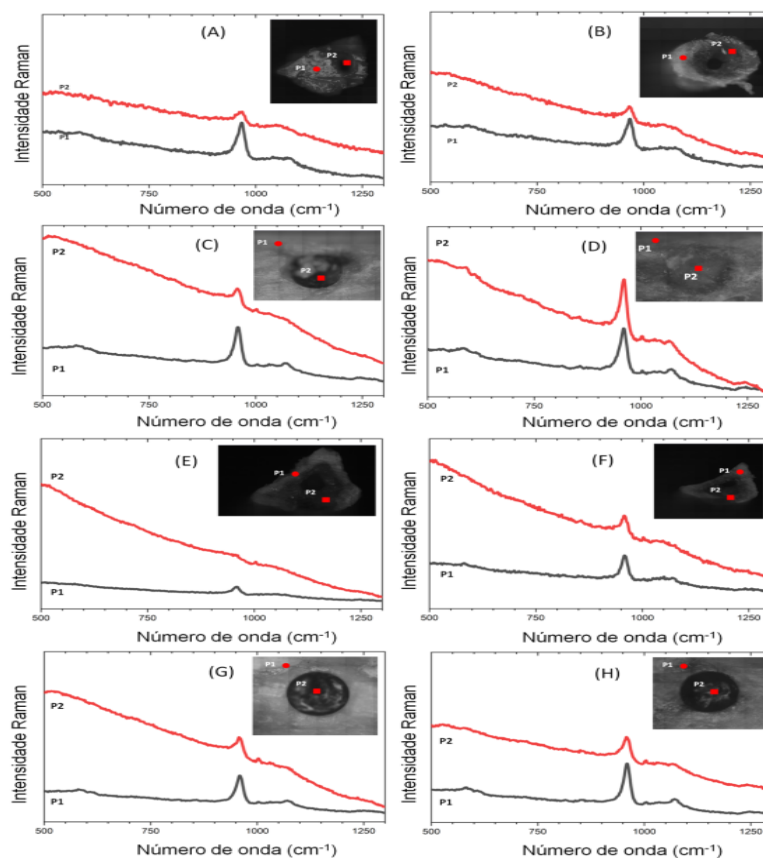


Figura 6 - Representação da intensidade da regeneração óssea dos grupos: grupo III– Controle Negativo (a)15 dias e (b) 30 dias; grupo IV – Controle Positivo (c) 15 dias e (d) 30 dias; grupo I – Agrião Tópico (e) 15 dias e (f) 30 dias; grupo II –Agrião Oral (g) 15 dias e (h) 30 dias.

Para uma análise com precisão dos resultados obtidos através dos espectros Raman, foi realizado os seguintes estudos dos espectros: (i) foram identificadas às intensidades e áreas dos picos cm^{-1} 967 fora e dentro da lesão para 15 e 30 dias para cada amostra; dados nas tabelas 1 e 2;(ii) de posse destas intensidades e áreas foi realizando a normalização destas dividindo as intensidades e área destes picos pela respectiva intensidades e área do pico das análises fora da lesão, Quando dividimos a intensidade e a área dos picos fora da lesão o resultado é 1, mas quando dividimos a intensidade e a área dos picos da lesão pôr as respectivas intensidades ou a área dos picos fora da lesão, o resultado é o percentual de regeneração óssea em comparação ao obtido fora da lesão.

Tabela 1: Valores das intensidades do pico em $\sim 967 \text{ cm}^{-1}$ fora e dentro da lesão.

		Intensidade fora da Lesão	Intensidade na Lesão	Razão da int. do pico fora da lesão	Razão da int. do pico na lesão
G- I	15	239,1	114,1	1	0,5
	30	263,3	216,5	1	0,8
G- II	15	995,1	604,8	1	0,6
	30	1055,4	570,1	1	0,5
G-III	15	1295,1	563,3	1	0,4
	30	1099,4	1379,9	1	1,3
G-IV	15	374,1	110,8	1	0,3
	30	340,7	150,2	1	0,4

Tabela 2: valores das Áreas do pico em $\sim 967 \text{ cm}^{-1}$ fora e dentro da lesão

		Área fora da Lesão	Área na Lesão	Razão da área do pico fora da lesão	Razão da área do pico na lesão
G-I	15	5081,5	2487,9	1	0,5
	30	5433,5	4534,1	1	0,8
G-II	15	19863,1	11708,5	1	0,6
	30	19199,9	10935,1	1	0,6
G-III	15	28750,9	12586,4	1	0,4
	30	25436,5	28922,6	1	1,1
G- IV	15	10200,2	2480,5	1	0,2
	30	7965,3	3039,1	1	0,4

Os resultados apresentados nas tabelas 1 e 2 mostram que a forma de administração, via oral e tópica do agrião (G-I e G-II), apresentam resultados similares com significativa regeneração óssea quando comparado com preenchimento tópico com Bio oss® (G-III).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o estudo mostra que o extrato do caule do agrião *Nasturtium officinale* R. Br. (agrião) na forma tópica e oral, atua na resposta na atividade antiinflamatória e osteocondutora e que possivelmente favoreceu a neoformação óssea.

5. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, U. P. Implications of ethnobotanical studies on bioprospecting strategies of new drugs in semi-arid regions. **The Open Complementary Medicine Journal**, v. 2, p. 21-23, 2010.

AUNG, T. N.; QU, Z.; KORTSCHAK, R. D.; ADELSON, D. L. Understanding the effectiveness of natural compound mixtures in cancer through their molecular mode of action. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 3, p. 656, 2017.

BENZIE, I. F. F.; WACHTEL-GALOR, S. **Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects**. Flórida: CRC Press, 2011.

BLOKHUIS, T. J.; ARTS, J.J.C. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: Definitions, facts and myths. **Int J Care Injured**, v. 42, p. 26-29, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Brasília 2018.

CASHMAN, K. D. Calcium intake, calcium bioavailability and bone health. **British Journal of Nutrition**, Oxon, v. 87, n. suppl. 2, p. s169-s177, 2002.

COELHO, N. P. F.; et al. FT-Raman spectroscopic study of skin wound healing in diabetic rats treated with *Cenostigma macrophyllum* Tul. **Rev Bras Eng Bioméd**, v. 30 n. 1, p. 47-53, 2014.

DO BRASIL, Espécies da Flora. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 24/08/2019.

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

- GONZÁLEZ-VALLINAS, M.; GONZÁLEZ-CASTEJÓN, M.; RODRÍGUEZ-CASADO, A.; RAMÍREZ DE MOLINA, A. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. **Nutrition reviews**, v. 71, n. 9, p. e585599, 2013.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Guyton & Hall -Tratado de fisiologia médica**. 13^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.
- KAUR, V.; et al. Pharmacotherapeutic potential of phytochemicals: Implications in cancer chemoprevention and future perspectives. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 564-586, 2018.
- KUMAR, R.; et. al. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* soil as a potential source of antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity. **Int J Food Microbiol**, v. 115, p. 159–164, 2007.
- LEITE, J. P. V.; et al. Plantas medicinais no entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. MG. **BIOTA**, v.1, n.4, p.16-34, 2008.
- 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. **Braz Arch Biol Technol**, v. 57, n. 3, p. 334-339, 2014.
- MARAO, H. F.; et al. Regeneração óssea guiada com uso de matriz óssea bovina desmineralizada em defeitos ósseos experimentais em cães. **Rev Bras Cir Cranio maxilofac**, v. 14, n. 2, p. 86-90, 2011.
- MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária: Farmacologia e técnicas**. 5^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- MCLEAN, F. C.; HASTINGS, A. B. The state of calcium in the fluids of the body I. The conditions affecting the ionization of calcium. **J Biol Chem**, v. 108, p. 285-322, 1935.
- ROQUE, A. A.; ROCHA, R. M.; LOIOLA, M. I. B. Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural de Laginhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 12, n. 1, p. 31-42, 2010.
- SADEGHI, H.; et. al. In vivo anti-inflammatory properties of aerial parts of *Nasturtium officinale* **Pharmaceutical biology**, v. 5, n. 2, p.167-178, 2014.
- 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. **Ver Bras Pl Med**, v. 16, n. 3, p. 637-643, 2014.
- SARAIVA, G. L.; LAZARETTI-CASTRO, M. Marcadores bioquímicos da remodelação óssea na prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 1-7, 2002.
- SAXENA, M.; SAXENA, J.; NEMA, R.; SINGH, D.; GUPTA, A. Phytochemistry of medicinal plants. **Journal of pharmacognosy and phytochemistry**, v. 1, n. 6, 2013.
- SERVICE, R. F. Tissue engineers build new bone. **Science**, v. 289, p. 1498-500, 2000.
- VIEIRA, J. G. H. Diagnóstico laboratorial e monitoramento das doenças osteometabólicas. **J Bras Patol Med Lab**, v. 43, n. 2, p. 75-82, 2007.