

Universidade Federal do Maranhão  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
**Mestrado**

**ESTUDO DA AÇÃO DE *Persea americana* Mill. NA  
CONSOLIDAÇÃO DE FRATURA OSSEA EM RATOS**

**PRISCYLLA GOUVEIA MENDONÇA**

São Luís  
2021

PRISCYLLA GOUVEIA MENDONÇA

**ESTUDO DA AÇÃO DE *Persea americana* Mill. NA  
CONSOLIDAÇÃO DE FRATURA OSSEA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dr. Maria do Socorro de Sousa  
Cartágenes

Co-orientador: Prof. Dr. João Batista dos Santos Garcia

São Luís

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Gouveia Mendonça, Priscylla.

ESTUDO DA AÇÃO DE *Persea americana* Mill. NA  
CONSOLIDAÇÃO DE FRATURA OSSEA EM RATOS / Priscylla Gouveia  
Mendonça. - 2021.

78 p.

Coorientador(a): JOÃO BATISTA DOS SANTOS GARCIA.

Orientador(a): MARIA DO SOCORRO DE SOUSA CARTÁGENES.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,  
SÃO LUÍS, 2021.

1. Fratura. 2. *Persea americana* Mill. 3.  
Procianidinas. 4. Reparo. 5. Tíbia. I. DE SOUSA  
CARTÁGENES, MARIA DO SOCORRO. II. DOS SANTOS GARCIA, JOÃO  
BATISTA. III. Título.

PRISCYLLA GOUVEIA MENDONÇA

**ESTUDO DA AÇÃO DE *Persea americana* Mill. NA  
CONSOLIDAÇÃO DE FRATURA OSSEA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em        /        /

---

Prof. Dr.<sup>a</sup>. MARIA DO SOCORRO DE S. CARTÁGENES  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr.<sup>a</sup>. CLAUDIA QUINTINO DA ROCHA  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. RAFAEL CARDOSO CARVALHO  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. JOSÉ OSVALDO BARBOSA NETO  
Centro Universitário do Maranhão

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de reencarnar e evoluir.

Ao meu pai Raimundo (in memorian) e minha Mãe Iracema, por todo amor, carinho e doçura na minha criação. Por me ensinarem o sentido da vida em família.

A minha irmã gêmea Pollyanna que me proporciona momentos felizes e alegres nessa caminhada. Te amo mais que tudo nesse mundo.

A minha sobrinha e afilhada Maria Laura por alegrar minha vida nessa volta difícil para São Luís.

As minhas tias maternas, Perolina e Cecília por todo amor desde a infância.

As minhas tias paternas, Hildenê e Ivone que financiaram meus estudos e me acolheram no Rio de Janeiro quando precisei.

Ao meu amigo Caio Viana, que me ajudou todos os dias nesse experimento. Pela lealdade e parceria que formamos.

A Lara, pela ajuda diária na natação. Obrigada.

A minha amiga Tázia pela parceria de sempre no laboratório.

A minha orientadora prof Dr Socorro, por ter me aceito no grupo de pesquisa, por toda calma e respeito de sempre. Sou grata demais!

Aos meus amigos de turma do Mestrado, tenho orgulho da nossa turma. Vocês me inspiram para tentar melhorar sempre.

E aos animais que se sacrificaram para execução deste trabalho, os quais eu respeitei durante todos os procedimentos... foi necessário.

## SUMÁRIO

|     |                                                                                |    |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1   | Introdução                                                                     | 14 |
| 2.  | Referencial teórico                                                            | 15 |
| 2.1 | A importância dos produtos naturais para os países em desenvolvimento          | 15 |
| 2.2 | A espécie <i>Persea americana</i> Mill                                         | 15 |
| 2.3 | Estudos sobre <i>Persea americana</i> Mill                                     | 17 |
| 2.4 | Fraturas ósseas e seus problemas associados                                    | 23 |
| 3.  | Objetivos                                                                      | 28 |
| 3.1 | Objetivo Geral                                                                 | 28 |
| 3.2 | Objetivos específicos                                                          | 28 |
| 4   | Material e métodos                                                             | 29 |
| 4.1 | Coleta de material vegetal                                                     | 29 |
| 4.2 | Obtenção do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Persea americana</i> Mill. | 29 |
| 4.3 | Animais                                                                        | 30 |
| 4.4 | Protocolo Experimental                                                         | 30 |
| 4.5 | Técnica cirúrgica para confecção da fratura                                    | 34 |
| 5.0 | Análise por Cromatografia Líquida Acoplada por Espectrometria de Massas        | 37 |
| 6.0 | Atividade enzimática da ciclooxigenase 1 (COX 1) e ciclooxigenase 2 (COX 2)    | 37 |

|      |                                                                                                |    |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.0  | Análise Bioquímica do sangue                                                                   | 38 |
| 8.0  | Avaliação Clínica                                                                              | 38 |
| 8.1  | Avaliação de Atividade Motora/Deambulação Forçada                                              | 38 |
| 8.2  | Teste de Incapacitância/ Distribuição do Peso nos membros traseiros                            | 39 |
| 9.0  | Análise Radiográfica                                                                           | 39 |
| 10   | Análise histológica do tecido ósseo                                                            | 40 |
| 11   | Análise estatística                                                                            | 41 |
| 12   | Resultados                                                                                     | 41 |
| 12.1 | Análise por Cromatografia Líquida Acoplada por Espectrometria de Massas                        | 41 |
| 12.2 | Determinação da atividade enzimática da ciclooxigenase 1 (COX 1) e ciclooxigenase 2 (COX 2).   | 44 |
| 13   | Bioquímica                                                                                     | 44 |
| 14   | Análise das alterações radiológicas na cicatrização das fraturas                               | 45 |
| 15   | Avaliação Clínica                                                                              | 46 |
| 15.1 | Avaliação de Atividade Motora/Deambulação Forçada ( <i>RotaRod Test</i> )                      | 46 |
| 15.2 | Teste de Incapacitância/ Distribuição do Peso nos membros traseiros ( <i>Weight Bearing</i> ). | 48 |
| 16   | Histologia do tecido ósseo                                                                     | 49 |
| 17   | Discussão                                                                                      | 51 |

|    |                            |    |
|----|----------------------------|----|
| 18 | Conclusão                  | 55 |
| 19 | Referências Bibliográficas | 56 |
|    | ANEXOS                     | 76 |



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                 |                                                                               |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| SUS             | Sistema Único de Saúde                                                        |
| PNPIC           | Política Nacional de Práticas Complementares e Integrativas do SUS            |
| RENISUS         | Relação Nacional de Plantas Medicinais e de Fitoterápicos de interesse ao SUS |
| LEED            | Laboratório Experimental de Estudo da Dor-LEED                                |
| EHPA            | Extrato Hidroetanólico das folhas de <i>Persea americana</i> Mill.            |
| COX-1           | Ciclooxygenase 1                                                              |
| F.PaAcet        | Fração Acetato de Etila                                                       |
| F.Pa.But        | Fração Butanólica                                                             |
| TGF- $\beta$ 1  | Fator de crescimento transformador beta 1                                     |
| (BMP-2)         | Proteína morfogenética óssea 2                                                |
| (DPPH)          | 2,2-Difenil-1-picril-hidrazil                                                 |
| HPLC            | Cromatografia líquida de alta eficiência                                      |
| (HPLC-MS),      | Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa   |
| GC-MS           | Espectrometria de Massa de Cromatografia Gasosa                               |
| GC-FID          | Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização em chama               |
| UNIPROTKB       | Base de conhecimento Universal de Proteínas                                   |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono                                                            |

|      |                                                              |
|------|--------------------------------------------------------------|
| ACSM | <i>American College of Sports Medicine</i>                   |
| EHS  | Extrato hidrossolúvel de soja                                |
| MC   | Macho controle                                               |
| MS   | Macho suplementado                                           |
| FC   | Fêmea controle                                               |
| FS   | Fêmea suplementada                                           |
| S    | Sódio                                                        |
| FE   | Fratura extrato                                              |
| FEN  | Fratura extrato natação                                      |
| FN   | Fratura natação                                              |
| F    | Fratura                                                      |
| DBCA | Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais |

## TABELAS

|          |                                                                                                                                                                       |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Tabela 1 | Levantamento Etnofarmacológico da espécie <i>Persea americana</i> Mill.                                                                                               |
| Tabela 2 | Descrição dos parâmetros para classificação da fase de consolidação da fratura conforme descrição de Allen et al., 1980.                                              |
| Tabela 3 | Contituíntes químicos identificados no extrato hidroetanólico de <i>Persea americana</i> Mill., por cromatografia líquida acoplada á espectrometria de massas (LC-MS) |
| Tabela 4 | Resultado dos Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos e valores de referências.                                                                                        |

## FIGURAS

- Figura 1      Área de cultivo da *Persea Americana* em zona rural do município de Paço do Lumiar, Estado do Maranhão, Brasil. Abril 2019.
- Figura 2      Coleta de folhas de *Persea americana* Mill.
- Figura 3      Primeiro momento de adaptação. Animal em água com profundidade de 6cm onde permaneceu por 5 minutos durante o primeiro e segundo dias.
- Figura 4      Segundo momento de adaptação. Animal em água com profundidade de 16cm onde permaneceu por 8 minutos durante o terceiro, quarto e quinto dias. Neste momento mostra interesse em apoiar-se nas bordas da caixa.
- Figura 5      Terceiro momento de adaptação. Animal em água com profundidade de 100cm onde permaneceu por 10 minutos durante o sexto e sétimo dias. Neste momento demonstra desenvoltura e adaptação completa ao meio aquático.
- Figura 6      Fluxograma do delineamento experimental
- Figura 7      Esquema representativo do delineamento experimental. Imagem ilustrativa do protocolo experimental, com detalhamento dos períodos de adaptação e eutânsia.
- Figura 8      Imagens radiograficas após indução das fraturas.
- Figura 9      A-Imagem de fratura realizada em um dos animais. B-Imagem do membro suturado.
- Figura 10      Os animais se recuperando da anestesia, antes de serem colocados nas gaiolas.
- Figura 11      Posicionamento dos animais no Raio X.
- Figura 12      Animal em aparelho RotaRod.
- Figura 13      Animal em aparelho Weight Bearing.
- Figura 14      Percentual de inibição da Cicloxigenase (COX-2) *in vitro*, induzido pelo EHPA, testado nas concentrações de 2µg/mL, 10µg/mL e 50µg/mL.
- Figura      Cromatograma de extrato hidroetanólico de *Persea americana* Mill.

- Figura 16 Estruturas químicas dos compostos identificados no Extrato hidroetanólico de *Persia americana* Mill.
- Figura 17 Radiografias de fratura de tíbias em ratos Wistar em diferentes semanas.
- Figura 18 Efeito da administração do EHPA no teste de Atividade Motora/Deambulação Forçada (*RotaRod Test*), em modelo de fratura de tíbia de rato.
- Figura 19 Efeito da administração do EHPA no teste de incapacidade funcional (*Weight Bearing*) em modelo de fratura de tíbia de ratos.
- Figura 20 Cortes histológicos exemplares de tíbias demonstrando o grau de consolidação.
- Figura 21 Cortes histológicos exemplares do baço (A), fígado (B) e rim (C)

## RESUMO

Resumo: Os tratamentos para fraturas ósseas têm melhorado nos últimos anos, mas alguns ainda apresentam distúrbios de consolidação. As fraturas expostas mais frequentes ocorrem na tíbia, com prevalência variando de 20 a 40% dos casos. A crescente utilização de produtos naturais, principalmente plantas medicinais e compostos relacionados com estudos fitofarmacêuticos, explica a existência de um vasto leque para desenvolvimento de novos medicamentos, para tratamento de patologias e afecções associadas. Objetivos: Avaliar a eficácia da administração do extrato hidroetanólico das folhas da *Persea Americana* Mill. na consolidação de fraturas de tíbia em ratos submetidos ou não à atividade física. Metodologia: Cinco grupos experimentais com 6 animais. Grupo Saudável (H): Sem intervenção; Fratura + Extrato (FE): Fratura induzida e EHPA oral; Fratura + Extrato + Natação (FEN): Fratura induzida, EHPA e 30 min de natação diária; Fratura + Natação (FN): Fratura induzida, natação por 30 min; e Fratura (F): Fratura induzida. A dose de 750mg / kg de EHPA administrada por gavagem oral 28 dias. Resultados: Por meio da caracterização pela cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa do extrato de *Persea americana* Mill. apresentou 24 substâncias, ionizadas de modo positivo e negativo, 17 já descritas na literatura. A porcentagem de inibição da (COX-2) in vitro, induzida pelo EHPA, foi de até 55% sendo proporcional ao aumento da dose. Os parâmetros comportamentais, os efeitos radiológicos e a histologia do tecido ósseo corado com hamatoxilina eosina são melhores em grupos tratados com EHPA (750mg / kg). A histologia do baço, fígado e rim não mostrou alterações patológicas e a dose administrada não induziu toxicidade.

Palavras-chave: *Persea americana* Mill.; procianidinas, fratura; reparo; tíbia; ratos

## ABSTRACT

**Abstract:** Treatments for bone fractures have improved in recent years, but some still show consolidation disorders. The most frequent open fractures occur in the tibia, with prevalence ranging from 20-40% of cases. The increasing use of natural products, mainly medicinal plants and compounds related to phytopharmaceutical studies, explain the existence of a wide scope for the development of new drugs, particularly of vegetable origin to treat pathologies and associated conditions. **Objectives:** To evaluate the effectiveness of the administration of hydroethanolic extract of the leaves of *Persea Americana* Mill. in the consolidation of tibial fractures in rats submitted or not to physical activity. **Methodology:** Five experimental groups with 6 animals. Healthy Group (H): Without intervention; Fracture + Extract (EF): Induced fracture and oral EHPA; Fracture + Extract + Swimming (SEF): Induced fracture, EHPA and 30 min of daily swimming; Fracture + Swimming (SF): Induced fracture, swimming for 30 min; and Fracture (F): Induced fracture. The dose of 750mg/kg EHPA administered by oral gavage 28 days. **Results:** Through characterization using the liquid chromatography dereplication technique coupled to the mass spectrometry of the extract of *Persea Americana* Mill. we identified 24 substances, ionized in positive and negative mode, 17 already described in the literature. Behavioral parameters, radiological effects and histology of bone tissue stained with hematoxylin and eosin are better in groups treated with EHPA(750mg/kg). Histology of the spleen, liver and kidney did not show pathological changes and the dose administered did not induce toxicity.

**Keywords:** *Persea Americana* Mill; procyanidin; fractures; repair; tibial; rats

## 1-INTRODUÇÃO

Nas primícias da civilização pré-histórica, os seres humanos buscavam alívio e tratamento de suas dores usando produtos naturais, como plantas, animais (PIAO *et al.*, 2016). No Brasil, a biodiversidade e o potencial econômico da flora brasileira, demonstra a riqueza em plantas produtoras dos mais diferentes insumos, bem como o potencial medicinal de várias espécies. A indústria de plantas medicinais e de fitoterápicos torna-se uma excelente alternativa ao acesso a medicamentos seguros, eficazes, de qualidade e a preços acessíveis (HASENCLEVER *et al.*, 2017). Representa a possibilidade de ampliação de opções terapêuticas ofertadas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) na perspectiva de melhoria da atenção à saúde e de inclusão social.

Dentro da prática para tratamentos não invasivos, foi pactuada na Comissão Intergestores Tripartite, aprovada pelo Conselho Nacional de Saúde no ano de 2005 e publicada por meio de Portaria GM nº 971, de 03 de maio de 2006, a Política Nacional de Práticas Complementares e Integrativas do SUS (PNPIC) que propôs a inclusão das Plantas Medicinais e dos Fitoterápicos como opções terapêuticas no Sistema Público de Saúde (BRASIL, 2012). A PNPIC contempla diretrizes e responsabilidades institucionais para oferta de serviços e produtos de homeopatia, plantas medicinais e fitoterapia entre outros. Em março de 2017, a PNPIC foi ampliada em 14 outras práticas a partir da publicação da Portaria GM nº 849/2017 ampliando as abordagens de cuidado e as possibilidades terapêuticas para os usuários, garantindo maiores integralidade e resolutividade da atenção à saúde (BRASIL, 2018).

Essa política traz dentre suas diretrizes a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e de Fitoterápicos de interesse ao SUS (RENISUS), em 2009. Uma lista com 71 diferentes espécies vegetais de interesse ao SUS visando o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápico pela população (BRASIL, 2014). Ressalta-se que a espécie estudada, *Persea americana* Mill, encontra-se listada na posição 48, conhecida popularmente como abacateiro. Tem sido utilizada na medicina recente e tradicional na prevenção e tratamento de doenças artríticas (MAHEU *et al.*, 2014).

No Maranhão, o Laboratório Experimental de Estudo da Dor-LEED já estuda a *Persea americana* Mill na dor neuropática, osteoartrite e nos seus mecanismos de ação. Considerando o emprego popular e a comprovação do efeito analgésico mostrado por esta espécie vegetal, optou-se por uma nova linha de pesquisa no referido laboratório,



utilizando-se da fratura como objeto de estudo. A hipótese estabelecida para este projeto é: O extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* Mill. (EHPA) possui eficácia em modelo experimental na consolidação de fraturas de tíbias em ratos.

## **2-REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1- A importância dos produtos naturais para os países em desenvolvimento**

O uso de plantas sem qualquer padronização química ou biológica para tratar inúmeras doenças levou a criação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, que estabelecem diretrizes e linhas prioritárias para desenvolvimento de ações e inovações fortalecendo cadeias e arranjos produtivos ao uso sustentável da biodiversidade brasileira (DANIA, 2013).

O uso de plantas medicinais é uma prática secular, baseada em conhecimentos populares e transmitida por diversas gerações. Assim, sempre houve busca por terapias não invasivas. O uso racional compreende a prescrição apropriada fundamentada no emprego de plantas e preparações derivadas com qualidade, segurança, eficácia, com disponibilidade oportuna e a preços acessíveis, garantindo a dispensação em condições adequadas e o consumo nas doses indicadas, nos intervalos definidos e no período de tempo indicado (JOÃO, 2010).

### **2.2-A espécie *Persea americana* Mill.**

O gênero *Persea* contém cerca de 50 espécies, uma delas sendo a *americana*, adicionando a abreviatura do seu descritor, portanto, designou-se *Persea americana* Mill. Como a própria nomenclatura indica, originou-se no Novo Mundo, bem como a maioria das espécies e algumas tem suas origens ligadas ao sudeste da Ásia (BERGH; ELLSTRAND, 1986). As primeiras referências sobre o abacate foram feitas por navegadores ainda nos primeiros anos do descobrimento da América, entre 1526 e 1554 em relatos descrevendo plantas encontradas na antiga cidade do México e no local onde hoje é a Colômbia. Nesses relatos os abacates receberam várias denominações, como nahuati e ahuacati, provavelmente de origem indígena.

O botânico sueco Carolus Linnaeus, classificou o abacateiro no gênero *Laurus*, mas no “Dicionário dos Jardineiros” (1754), Miller publicou uma descrição do gênero *Persea*, nomenclatura já utilizada anteriormente por outros estudiosos, e ao que tudo

indica aparentemente oriunda da mitologia grega não existindo outras referências ou conexões históricas (BERGH; ELLSTRAND, 1986).

Pesquisas arqueológicas indicam que o abacateiro era explorado na região há mais de 10 mil anos (KOLLER, 1984). Do ponto de vista geográfico, existem três espécies distinguíveis de abacate, a mexicana (*Persea americana* variedade *drymifolia*), da Índia ocidental (*Persea americana* variedade *americana*) e a guatemalteca (*Persea nubigena*) variedade *nubigena* e *Persea nubigena* variedade *guatemalensis*. As variedades comerciais existentes são híbridas dessas raças, Hass, Fuerte e Pinkerton. (DEEPTI D *et al.*, 2013).

A árvore de *Persea americana* Mill. mede de 10 a 15 metros, possui córtex aromático e caule lenhoso. A família Laureaceae é considerada uma das famílias mais primitivas pertencentes à divisão Magnoliophyta (CRONQUIST, 1988). Sua copa geralmente é ampla, que pode ser reta, espalhada ou arredondada, as folhas são grandes entre 9 a 18 cm de comprimento, lisas, coriáceas, de cor verde escura, formato oval-oblongas, de margens inteiras, mais ou menos onduladas, brilhantes na face superior e foscas na inferior, podendo ser mais avermelhadas quando novas (MARANCA, KOLLER, 1992), segue abaixo Figura 1 da *Persea americana* Mill.



Fonte: MENDONÇA, P.G. Abril 2019.

Figura 1: Área de cultivo da *Persea americana* Mill. em zona rural do município de Paço do Lumiar, Estado do Maranhão, Brasil. Abril 2019.

As flores são andróginas ou hermafroditas, são pequenas, perfumadas, de cor branca a verde-amarelada, reunidas em racemos axilares e terminais, formadas na primeira e dispostas em inflorescências do tipo cacho. As flores atraem bastantes abelhas e por isso, o abacateiro é uma planta melífera (CANTO, SANTOS E

TRAVAGLINI, 1978). Seu fruto é comestível e tem forma de drupa esférica e de cor verde amarelada, sua polpa é oleosa, amarelada e similar à manteiga.

A espécie prefere os solos sílico argiloso, férteis e profundos (Farmacopéia, 2010). O fruto do abacateiro é bastante conhecido pelas propriedades nutricionais, rica em proteínas e gordura, contendo ainda fósforo que auxilia na formação de ossos e dentes e evita a fadiga mental. Suas flores são pequenas, brancas amareladas e dispostas em forma de cacho (ALONSO, 2004) (SANTOS et al., 1988).

### **2.3-Estudos sobre *Persea americana* Mill.**

As extrações aquosas e metanólica das folhas do abacateiro demonstraram atividade hipotensiva dose-dependente quando testadas em camundongos. No entanto, seu efeito é rápido e passageiro, não ultrapassando 3 minutos, o que pode ser devido ao acelerado metabolismo dos animais testados. Os extratos eram administrados pela via intravenosa e a pressão, então, era mensurada com auxílio de um cateter acoplado à artéria carótida. Não foram observadas diferenças significativas entre a ação hipotensiva do extrato aquoso e do metanólico (ADEBOYE, 1998).

O extrato aquoso possui ação vasorelaxante, provavelmente devido à inibição do fluxo de  $Ca^{++}$  pelos canais voltagem dependentes e fatores relaxantes derivados do endotélio vascular. O teste foi feito a partir de anéis de aorta isolados de ratos. Estes anéis foram previamente contraídos com noradrenalina, seguido de adição do extrato aquoso. A ação vasorelaxante foi observada comparando a dilatação do anel da aorta induzida pelo extrato com diversos fármacos vasorelaxantes sintéticos (OWOLABI, 2005).

Os extratos aquosos e metanólicos das folhas de *Persea americana* Mill. apresentaram ação hipoglicemiante (redução de 16 e 11% de glucose sanguínea respectivamente) e hipocolesterolemiantes (redução de 8 e 5% de colesterol totais respectivamente) em ratos. O estudo foi realizado com ratos albinos com hipercolesterolemia induzida (concentração de glucose e colesterol total elevadas no plasma) a partir de uma dieta composta de 20% de óleo de amendoim, 0,5% de colesterol e 0,25% de ácido cólico. Estes ratos foram submetidos a um tratamento com os extratos aquosos e metanólicos por oito semanas (BAHAR I, 2007).

No Brasil, as preparações advindas desta espécie são utilizadas para o combate a problemas renais, ação diurética e anti-hipertensiva, vermífugo, anemia, helmintíases, reumatismo, e ajuda na prevenção de câncer, tendo o caroço, folha e flor como as partes

utilizadas pela população local (REGO, 1995) (PAMPLONA; ROGER 1999) (LU et al., 2005) (BARBOSA et al., 2010). As partes mais utilizadas como fontes de pesquisas são as folhas, a casca, o fruto e a semente, por apresentarem composições químicas variadas. As principais substâncias encontradas são carboidratos, proteínas, gordura, taninos, metileugenol, dopamina, esparagina, ácidos málico, acético, gordura monoinsaturada e carotenóides. Já existem estudos sobre a correlação entre a fração aquosa das folhas de *Persea americana* Mill. e atividade anti-edema, sendo esta evidenciada através de testes como da carragenina, teste da formalina, dentre outros (ADEYEMI et al., 2002).

A infusão das folhas tem atividade espasmogênicas sobre o íleo de suínos e útero de rata, como também efeito hipotensor e depressor do sistema respiratório. O extrato etanólico de folhas do abacateiro demonstrou um efeito diurético em ratos. O fruto, submetido à infusão, demonstrou uma ação larvicida sobre mosquitos *Anopheles gambiae*, uma espécie transmissora da febre amarela. Neste experimento, a ação larvicida do fruto imaturo foi notoriamente superior à ação da rotenona, um inseticida comum. O conjunto de proantocianidinas, taninos condensados, flavonas e catequinas seriam responsáveis por uma neutralização de hemorragias induzidas por veneno da serpente *Bothrops asper*. A atividade antimicrobiana é bastante descrita principalmente relacionada aos óleos essenciais da semente do abacate. Para os estudos da ação antitumoral, os resultados indicam o fruto imaturo e a polpa como as porções mais eficientes para este tipo de tratamento (ALONSO, 2004).

O LEED, da Universidade Federal do Maranhão, já desenvolve pesquisas com a *Persea americana* Mill. Um dos primeiros estudos demonstrou a ação anti-inflamatória e antinociceptiva do (EHPA) em diferentes ensaios. A ação anti-inflamatória do EHPA envolve o processo de inibição das enzimas Cicloxigenases, principalmente a COX tipo 2, em sinergismo com a modulação de histamina e/ou serotonina. O EHPA apresentou efeito central, sugerindo o antagonismo de receptores do tipo NMDA. O tratamento com EHPA 250 e 500mg/kg reduziu o edema de pata induzido por carragenina em 40% e 70%, respectivamente. O EHPA (50, 250 e 500mg/kg) reduziu a nocicepção causada pelo ácido acético, assim como também na segunda fase (inflamatória) do teste de formalina (LIMA, 2018).

Um segundo estudo do LEED demonstrou que a administração oral do EHPA apresenta efeitos antinociceptivos com participação anti-inflamatória, sugerindo que esses efeitos possam estar ligados à presença de flavonoides, terpenos e fenóis; que

podem contribuir com a redução da atividade das enzimas COX 1 e COX 2, consequentemente reduzindo a dor de natureza neuropática. O ensaio *in silico* permitiu selecionar a substância  $\beta$ -amirina, sugerindo que, por essa molécula ter apresentado o melhor perfil de afinidade entre os compostos, com interações moleculares estáveis com COX 1 e COX 2 (FRANÇA, 2018).

Um terceiro estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do EHPA em modelo experimental de osteoartrite em joelhos de ratos. O tratamento por via oral na dose de 500mg/Kg HEPA foi eficaz para reduzir a dor em osteoartrite através da avaliação dos parâmetros clínicos/comportamentais utilizados (deambulação forçada, sensibilidade tátil e hiperalgesia mecânica) em ambos os protocolos de tratamento. A utilização de *Persea americana* Mill. sugere uma melhora no comprometimento articular e cartilaginoso, mostrando resultados positivos nas radiografias e análise histopatológica. (BONFIM, 2019).

O quarto estudo do grupo, investigou os possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da fração acetato de etila (F.PaAcet) e butanólica (F.PaBut) da espécie vegetal na dose de 500mg/kg. Avaliou-se a participação da via opióide, L-arginina-óxido nítrico,  $\alpha$ -adrenoreceptores e sistema muscarínico na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das frações através do teste de nocicepção induzida por formalina e edema de pata por carragenina. As F.PaAcet e F.PaBut apresentaram ação anti-inflamatória significativa nas doses e concentrações testadas. Sugere-se que as frações tenham suas atividades associadas à modulação da liberação de óxido nítrico (NO) (CASTRO, 2020).

Em publicação recente, edição especial da *Pharmacology of Medicinal Plants*, o abacate teve destaque. Foram estudados extratos vegetais feitos de frutas e sementes de abacate e de soja, espécie já caracterizada pelos seus potentes efeitos antiinflamatórios. O estudo recomenda a mistura de abacate e soja como tratamento adjuvante da dor osteoartrítica e tratamento sintomático de ação lenta da osteoartrite do quadril e joelho; doenças autoimunes; esclerodermia difusa e estados semelhantes à esclerodermia. Além disso, foi relatado que pode melhorar o humor e a qualidade de vida das mulheres na pós-menopausa e na redução dos sintomas relacionados à menopausa (SALEH et al., 2020).

Outros autores relataram que os extratos etanólicos apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (exceto *Escherichia coli*), enquanto os extratos aquosos exibiram atividade contra *Listeria*

*monocytogenes* e *Staphylococcus epidermidis* (RAYMOND et al., 2010). O Extrato demonstrou eficácia contra a doença periodontal modulando a expressão do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1), TGF- $\beta$ 2 e proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) (ANDRIAMANALIJAONA et al., 2006).

O óleo de abacate contribui significativamente para a síndrome metabólica, reduz os eventos inflamatórios e exibiu resultados positivos nos indicadores bioquímicos (CARVAJA et al., 2014). Os feitos inibitórios do extrato fenólico da polpa, folhas e sementes de abacate foram realizados em várias enzimas do diabetes tipo 2 ( $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -glucosidase) (OBOH et al., 2014). Os esteróis, os principais componentes bioativos da ASU, também mostraram atividade anti-inflamatória em condrócitos articulares (LIPPIELLO et al., 2008).

As folhas foram amplamente estudadas por suas propriedades antioxidantes e diferentes estudos caracterizaram a presença de substâncias como os flavonoides, fenóis, alcaloides, esteroides e taninos (ANTIA et al., 2005). Em ensaios espectroscópicos convencionais o sal de diamônio do ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) apresenta capacidade de absorção de radicais de oxigênio, capacidade antioxidante redutora de cobre e capacidade de redução férrica do plasma, bem como análises analíticas mais sensíveis incluindo técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectrometria de massa de cromatografia líquida de alta performance (HPLC-MS), espectrometria de massa de cromatografia gasosa (GC-MS) e detector de ionização por chama de cromatografia em fase gasosa (GC-FID) (WYANG et al., 2010) (WANG et al., 2012) (SEGOVIA et al., 2016) (BOYADZHIEVA et al., 2018).

A caracterização fitoquímica das folhas do abacateiro, mostrou presença de flavonoides, saponinas, esteroides e taninos com atividade antioxidante superior a vitamina C, validando a potencial utilização do extrato das folhas do abacateiro como importante agente modulador no tratamento de patologias relacionadas ao estresse oxidativo (BOHARI et al., 2018).

Vários estudos relataram que diferentes partes das plantas de abacate contêm potentes antioxidantes fenólicos, como clorogênico, quinico, succínico, pantotênico, abscísico, ferúlico, gálico, sinapínico, *p*-camárico, gentísico, protocatecuico. -, ácidos 4-hidroxibenzóico e benzóico, quercetina, quercetina-3-glucósido, quercetina-3-ramnósido, vanilina, *p*-ciclomail-D-glicose, catequinas, (-) - epicatequina e

procianidinas (FIGUEROA et al., 2018; LÓPEZ et al., 2016; TREMOCOLDI et al., 2018).

Na Nígeria é tradicional a decocção de folhas de abacate para o tratamento de tumores e doenças relacionadas a tumores (ENGEL et al., 2011). Vários estudos investigaram as propriedades anti-inflamatórias do abacate através da modulação das respostas inflamatórias. Outra pesquisa destacou as propriedades curativas do óleo de abacate, aumentando a síntese de colágeno e diminuindo a inflamação em ratos Wistar (OLIVEIRA et al., 2013). Uma redução significativa da erosão da cartilagem articular e hemorragia sinovial em comparação ao placebo foi observada em cavalos usando extratos da ASU (KAWCAK et al., 2007).

Compostos fenólicos de diferentes classes químicas, de ácidos orgânicos simples, como ácido gálico a flavonóides maiores, antocianidinas e tocoferóis, foram isolados de espécies de *Persea americana* com atividades antioxidantes, neuroprotetoras e cardioprotetoras significativas (ORTEGA et al., 2019; RAMOS et al., 2013; SANTANA et al., 2019; BHATTACHJARYYA et al., 2010; LU et al., 2005; NAVEED et al., 2018). Considerando os riscos à saúde associados aos antioxidantes sintéticos, a extração, o isolamento e a identificação de antioxidantes de fontes naturais tornaram-se os principais focos de pesquisa das indústrias alimentícia, nutracêutica e farmacêutica nos últimos anos (BHUYAH et al., 2016).

Outro estudo investigou a capacidade de bactérias de ácido láctico autóctones selecionadas de compostos bioativos de abacate (*Persea americana* Mill.) na perspectiva de produzir suplementos alimentares ou preparações farmacêuticas. Foi desenvolvido um concentrado de abacate fermentado que resultou em altos níveis de aminoácidos livres totais. A fermentação também levou a um aumento acentuado da atividade antioxidante, com os níveis mais altos encontrados nos extratos solúveis em água e hexano. O ácido oleico e linoleico foram altamente metabolizados por *Lactobacillus plantarum* AVEF17, levando a altos níveis de ácido mono, di e tri-hidroxi-octadecenóicos (FILANNINO et al., 2020).

O extrato de semente de abacate foi misturado com maltodextrina e água e homogeneizado por 10 min a 8000 rpm. A solução de semente de abacate foi então seca por pulverização com diferentes temperaturas de entrada e taxas de fluxo de alimentação. O pó de semente de abacate seco por pulverização foi analisado quanto ao seu rendimento, teor de umidade, atividade da água, solubilidade e cor. Foi relatado que

a solução com a menor concentração de extrato de abacate (10 g) apresentou a melhor estabilidade em termos de presença de partículas e cor do soluto (ALISSA et al., 2020).

Abacate, Macadâmia e manga são importantes espécies subtropicais de árvores cultivadas por seus frutos e nozes comestíveis. Utilizando cDNA, foi gerado um conjunto de dados abrangentes de RNA-Seq, unigenes foram anotados funcionalmente usando a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para consultar a Base de conhecimento Universal de Proteínas (UniProtKb). Este estudo fornece dados valiosos para experiências com genes e perfil de expressão de genes, bem como para aplicações de anotação de genoma em andamento e futuras aplicações de desenvolvimento de marcadores (CHABIKWA et al., 2020).

Perante os inúmeros trabalhos aqui apresentados, e em virtude de na literatura não haver relatos sobre a validação pré-clínica da atividade consolidadora das folhas de *Persea americana* Mill. em fraturas ósseas e dose específica, justifica-se o interesse do grupo de pesquisa do LEED em investigar estas atividades no extrato hidroetanólico na dose de 750mg/kg. A Tabela 1 apresenta levantamento Etnofarmacológico da espécie *Persea americana* Mill. demonstrando as partes da planta utilizada, o seu preparo, as vias, o uso e as referências.

**Tabela 1.** Levantamento Etnofarmacológico da espécie *Persea americana* Mill.

| PAÍS                 | PARTES DA PLANTA      | PREPARO                                 | VIAS             | USO                                | REFERÊNCIAS                         |
|----------------------|-----------------------|-----------------------------------------|------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Brasil</b>        | Folhas, Broto/semente | Decocção<br>Infusão<br><i>In natura</i> | Oral             | Fígado, rim, Corrimento Mau hálito | Coelho-Ferreira.2009                |
| <b>Peru</b>          | Folhas                | Trituração                              | Cataplasma       | Trauma, contusões com edema        | Valadeau et al.,2010                |
| <b>Brasil</b>        | Folhas                | Decocção                                | Oral             | Dor nos rins                       | Cartaxo et al.,2010                 |
| <b>África do Sul</b> | Raiz                  | Oral                                    | Oral, 3x dia     | Diabetes, Hipertensão              | Semenya et al.,2012                 |
| <b>México</b>        | Folhas                | Decocção                                | Bochechos        | Cárie                              | Rosas-Pinón et al., 2012            |
| <b>Uganda</b>        | Folhas                | Decocção                                | Oral diariamente | Aumento do apetite e imunidade     | Asiimwe et al., 2013                |
| <b>Peru</b>          | Sementes              | Decocção ou infusão                     | Oral             | Diarréia, cólicas, úlceras         | Monigatti; Bussmann; Weekerle 2013  |
| <b>Guiné</b>         | Folhas                | Decocção                                | Oral             | Malária                            | Kamsu; Foguem; Diallo; Foguem, 2013 |



|                      |         |                  |                   |                                   |                                |
|----------------------|---------|------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| <b>Quênia</b>        | Folhas  | Pó               | Oral, 4,5g 3x dia | Câncer de pele, mama e colorretal | Ochwang'I et al., 2014         |
| <b>Maurícia</b>      | Fruto   | Suco com iogurte | Oral/Semanal      | Catarata, hipercolesterolemia     | Mootosamy, Mahomoodallyl. 2014 |
| <b>África do Sul</b> | Semente | Pasta            | Banho, tópico     | Limpeza facial, rugas             | Afolayan et al., 2014          |

Fonte: Adaptada de Sousa ZL. Methanolic leaf extract from *Persea americana* acts as fungicide against *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Disease Journal**, 2016.

## 2.4- Fraturas ósseas e seus problemas associados

Um dos graves problemas de saúde pública no mundo são as fraturas de tíbia. Dentre os pacientes que são vítimas de trauma fechados, as lesões do sistema músculo esquelético chegam a representar 85% dos atendimentos. Fraturas do terço médio de tíbias foram as mais frequentes por muitos anos. Estas possuem uma classificação pela Orthopaedic Trauma Association/Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (OTA/AO) e também possuem maiores opções de tratamento. As fraturas tipo A são classificadas como simples, as fragmentadas com cunha em B e as multifragmentadas complexas em C. Permitindo assim associar lesões as partes moles (JUNIOR et al., 2017).

Fraturas expostas de ossos longos ocorrem com uma incidência de 11,5 a 30,7 por 100 mil pessoas por ano (COURT et al., 2012) (GUMBEL et al., 2016). Estima-se que nos Estados Unidos da América tais fraturas representem custo anual de 230 milhões de dólares, o que indica o alto impacto socioeconômico dessas lesões (ARRUDA et al., 2009).

Na fratura fechada pode haver pouco ou nenhum movimento ou deslocamento dos ossos quebrados sem penetração no tecido superficial. No entanto, na fratura exposta, há deslocamento de extremidades fraturadas com o osso penetrando nos tecidos que circundam o local, inclusive na pele, que fica lacerada (PRENTICE, 2012). As fraturas expostas são particularmente difíceis de tratar devido a pobre cobertura das partes moles e reduzido suprimento sanguíneo em algumas regiões. Esta leva tratamento cirúrgico de urgência com desbridamento, antibioticoterapia, e estabilização óssea (RODRIGUES et al., 2014).

Apesar dos avanços ortopédicos para obtenção da consolidação óssea normal após fratura, aproximadamente 10% delas ainda apresentam atraso na consolidação ou se desenvolvem em pseudoartroses que podem causar incapacidade funcional (AZAD et al., 2009). A cicatrização é um dos processos mais estudados atualmente. Pesquisas têm avaliado a importância de sua estimulação na reabilitação funcional e estética do paciente (ROCHA, 2004). O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente especializado, vascularizado, dinâmico (reabsorção e neoformações fisiológicas constantes) e com grande capacidade de regenerar após sofrer injúrias, quando comparado com outro tecido muscular esquelético, nervoso, tendões, etc (BAHAR et al., 2007).

Embora os resultados do tratamento das fraturas tenham melhorado consideravelmente nos últimos anos, em virtude do maior conhecimento dos seus mecanismos e o respeito à biologia dos tecidos, parte delas ainda apresentam distúrbios de consolidação, principalmente em virtude da gravidade do trauma e de fatores sistêmicos que interferem negativamente no metabolismo (CLAES et al., 2012). As fraturas não consolidadas trazem grandes limitações para o paciente em virtude da dor, mobilidade anormal dos fragmentos e deformidades, chegando a impedir a sustentação.

Assim, sempre houve busca por terapias não invasivas para tratar as fraturas que tem potencial de consolidação limitado, ou já anomalias de consolidação que, por falta de condições clínicas do paciente, ou contra indicação cirúrgica em virtude de más condições locais, ou mesmo infecção que impedem o tratamento cirúrgico seja instituído (GUIMARÃES, 2017).

Na consolidação óssea normal, quatro fases distintas são imprescindíveis para que o reparo do tecido ósseo seja concluído: inflamação, formação calo ósseo mole, ósseo duro e remodelação (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2017). O processo tem início por um hematoma formado em resposta à lesão dos tecidos. Células progenitoras são recrutadas e chegam ao local da lesão, onde se proliferam e diferenciam-se em condrócitos e osteoblastos. Esse sistema de cascata que é desencadeado após a fratura contribui para o remodelamento das extremidades dos ossos fraturados, que ocorre pela combinação da ossificação endocondral e intramembranosa, garantindo a formação do calo ósseo, que consiste em tecido regenerado de preenchimento do espaço entre dois fragmentos ósseos e recupera a integridade mecânica desfeita pela fratura (FAZZALARI, 2011).

As fases do processo de cicatrização envolvem o pós-operatório onde o tecido sofre lesão pela cirurgia e ocorre a destruição tecidual, causando lesão diretamente na célula. A lesão celular culmina em alteração no metabolismo e liberação dos mediadores químicos, dando início à resposta inflamatória, com características peculiares como: calor, rubor, edema, sensibilidade alterada, dor e perda da funcionalidade. As estruturas musculoesqueléticas lesionadas passam pelo processo inflamatório que faz parte da reabilitação (PRETICE, 2012).

O tecido ósseo sofre remodelação cujo objetivo é recuperar a anatomia e a função original do osso antes da fratura. A remodelação óssea é o resultado de um processo dinâmico de formação e reabsorção do tecido ósseo, em que a reabsorção causa a deterioração desse tecido enquanto a formação do mesmo é responsável pela reconstrução e fortalecimento do tecido deteriorado (KAYAL et al., 2009; FAZZALARI, 2011).

As opções não invasivas para fraturas são limitadas na clínica médica. Os tratamentos mais utilizados são: com proteínas morfogenéticas ósseas, ultrassom pulsado de baixa intensidade, e um campo eletromagnético pulsado. A pesquisa de KRISHNAKUMAR et al. (2017), ADIE et al. (2011), entretanto, indicou que a eficácia desses tratamentos é limitada. Inúmeras pesquisas apontam que a utilização do exercício físico pode ser um meio efetivo no aumento da massa óssea e na minimização dos efeitos deletérios da imobilização (APOLINÁRIO et al., 2011).

Em relação aos agentes eletrofísicos, os efeitos do ultrassom (US) e a laserterapia de baixo nível (LLLT), estes muito utilizados na prática de fisioterapia. Foi investigado o processo de cicatrização óssea, por meio de análises biomecânicas e histológicas do calo ósseo. Alguns estudos sugerem que esses dispositivos são capazes de estimular a proliferação de osteoblastos e a osteogênese no local da fratura, resultando em uma maior deposição da massa óssea e acelerando o processo de consolidação. Neste não houve diferença estatística significativa entre os US e LLLT. Assim, ambos são capazes de acelerar o processo de cicatrização óssea em ratos (OLIVEIRA et al., 2011).

A eficácia da corrente russa na consolidação da fratura da tíbia em ratos adultos, sugeriram maior ossificação primária, intensa atividade osteogênica e aumento da espessura do periósteo, caracterizando ossificação mais avançada e maior presença de medula óssea trabecular em ratos do grupo submetido ao tratamento. Dessa forma, podemos atribuir mais um efeito benéfico às intervenções com corrente russa para o

tratamento da reabilitação pós-fratura. No grupo estimulado eletricamente o processo de osteogênese foi mais avançado (LIMA et al., 2017).

A aplicação cutânea tópica de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) por meio de um hidrogel melhora a absorção e acelera o reparo de fraturas em ratos, aumentando o fluxo sanguíneo e a angiogênese e promovendo a ossificação endocondral (KOGA et al., 2014). O primeiro estudo exploratório da terapia com CO<sub>2</sub> envolvendo pacientes humanos, avaliou a segurança da técnica e sua eficácia quando aplicada a pacientes com fratura. Dezenove pacientes foram submetidos à análise completa. Não foram observados eventos adversos. O sangue arterial não mostra efeitos sistêmicos adversos. A relação média do fluxo sanguíneo 20 min após a terapia com CO<sub>2</sub> em comparação com nível de pré-tratamento aumentou aproximadamente duas vezes em um período (NIKURAL et al., 2019).

Outro estudo avaliou o efeito do exercício físico e da administração de testosterona no processo de consolidação de fratura de tíbia e fíbula de ratos. O tamanho do calo ósseo foi maior no grupo submetido a tratamento combinando imobilização, exercício físico e testosterona. Os grupos tratados com testosterona - combinada ou não a programa de natação - apresentaram maiores níveis de fósforo e de fosfatase alcalina, além de menores níveis de proteínas totais e albumina. O grupo submetido ao programa de treinamento físico de natação combinado com a administração de testosterona obteve melhor consolidação óssea evidenciada pelo maior calo ósseo (CUNHA et al., 2012).

Uma hipótese proposta por alguns pesquisadores para o efeito da atividade física é a de que a contração muscular levaria a uma melhora do processo de consolidação óssea por aumentar o fluxo sanguíneo (PARK; SILVA, 2004). Além disso, os estímulos mecânicos iniciam uma cadeia de eventos envolvendo mensageiros intracelulares que resultam em formação óssea e aumento na massa óssea por efeitos na codificação celular apropriada (JAGODZINSKI; KRETTEK, 2007).

O aumento da massa muscular em resposta ao exercício promove maior tensão sobre a junção osteotendinosa, que resulta em maiores estímulos osteogênica, com consequente aumento na deposição de minerais no tecido ósseo (WAMOTO et al. 1999). Adaptações positivas do tecido ósseo a diferentes tipos de exercício físico têm sido observadas em ratos e ratas jovens e em seres humanos jovens de ambos os sexos. Diferentes modelos de exercício (corrida em esteira, natação contínua e salto em profundidade) causam efeitos positivos sobre a resistência óssea à fratura em ratos

(SHIGA et al., 2003), (HUANG et al., 2008), (HONDA et al., 2003), (WELCH et al., 2008), (TOURNIS et al., 2010).

Os programas de exercício físico, que incluem modalidades aeróbias e de resistência, são recomendados pelo *American College of Sports Medicine* (ACSM) como estratégias de prevenção e tratamento para várias populações (FRAJACOMO et al., 2013). A prática de atividade de baixa carga de treino, com carga moderada, o exercício auxilia no ganho de massa óssea, promovendo também alterações no metabolismo ósseo (LIU et al., 2011), (OCARINO; SERAKIDES, 2005).

A prática de atividade física, com uma carga moderada por quatro semanas, trará um aumento significativo na mineralização óssea dos membros superiores e inferiores, quando comparados com um grupo controle. Pode-se assim, incluir a atividades e exercícios físicos de locomoção para produzir um pico de massa óssea (ARGIN; ERDEN, 2009).

As atividades físicas mais intensas e de maior impacto causam maiores estímulos osteogênicos (VAINIONPAA et al., 2007). Todavia, nem sempre estas atividades podem ser executadas por indivíduos portadores de fragilidade óssea, o que torna a natação uma alternativa atraente. Há indicações que o treinamento em natação promove adaptações benéficas nas propriedades estruturais e mecânicas do osso, pois, embora não produza impacto, é capaz de estimular a osteogênese como consequência das contrações musculares (HUANG et al., 2003), (HUANG et al., 2010).

A comunidade científica tem mostrado interesse nos estudos referentes influências da atividade física na dinâmica do tecido ósseo. Sabe-se que a estrutura óssea se adapta ao tipo de carga mecânica aplicada. Modelos de atividades de alto impacto, como salto já demonstram benefícios às propriedades mecânicas ósseas, no que tange o ganho de massa óssea. Nas atividades de baixo impacto os mecanismos de adaptação óssea podem diferir da modalidade de alto impacto (FRAJACOMO et al., 2013).

Outro estudo avaliou a influência da dieta suplementada com extrato hidrossolúvel de soja (EHS) na massa óssea de ratos adultos jovens de ambos o sexo. Foram utilizados 40 ratos. Aleatoriamente, estes foram separados em quatro grupos: macho controle (MC), macho suplementado (MS), fêmea controle (FC) e fêmea suplementada (FS) que permaneceram por 11 semanas em gaiola comum recebendo 500 ml de água e 300g de ração diariamente, e os grupos suplementado (MS e FS), ao qual foi oferecido além de água e ração 500 ml de leite a base de soja, durante o mesmo

período experimental do controle. O consumo de EHS provocou diminuição da Densitometria óssea no grupo MS, porém não houve alteração nas propriedades biomecânicas, força máxima e rigidez (SHIGA et al., 2003).

Estudos mostram que a atividade física de baixa e moderada intensidade tem a capacidade de promover alterações no tecido ósseo, melhorando seus componentes, mesmo se executados por um curto período de tempo. Além disso, também é comprovado que a inatividade pode levar a uma perda relativa de massa óssea (APOLINÁRIO et al., 2011). No que tange a natação, utilizou reservatórios adaptados à sua prática com temperatura da água mantida em  $32 (\pm 1^\circ \text{C})$  (FRAJACOMO et al., 2013).

O treinamento de natação consistiu em um aumento semanal de 20 min até 60 min na terceira semana e foi mantido durante todo o protocolo, cinco dias por semana durante oito semanas sem a inclusão de sobrecarga adicional (VENDITTI; DI MELO 1996). A natação neste projeto foi selecionada devido ao seu ambiente natural para roedores e por gerar menos interferência devido ao impacto no solo, impedindo interferências na interpretação dos resultados.

Perante exposto, se fez necessária a realização deste experimento porque, como foi demonstrado nas inúmeras pesquisas não se relata a utilização do EHPA na consolidação de fratura óssea. Porém, já é de conhecimento da comunidade científica sua eficiência em processos inflamatórios. Como a fratura é igualmente um processo inflamatório a eficácia do extrato já demonstrada em dor neuropática, osteoartrite e mecanismo de ação.

### **3-OBJETIVOS**

#### **3.1- Geral**

Avaliar a eficácia da administração do extrato hidroetanólico das folhas da *Persea americana* Mill. na consolidação de fraturas de tíbia em ratos.

#### **3.2- Específicos**

- Caracterizar o EHPA por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa identificando compostos.
- Determinar a inibição enzimática da ciclooxigenase 1 (COX 1) e ciclooxigenase 2 (COX 2) no extrato hidroetanólico das folhas da *Persea americana* Mill.

- Avaliar parâmetros bioquímicos e hematológicos nos animais submetidos ao uso da *Persea americana* Mill.
- Avaliar o efeito do extrato hidroetanólico das folhas da *Persea americana* Mill. na consolidação de fraturas, a partir de parâmetros clínicos.
- Investigar as alterações radiológicas na cicatrização das fraturas.
- Verificar histologicamente as alterações do tecido ósseo de tíbias de ratos submetidos ao uso da *Persea americana* Mill.
- Verificar histologicamente se houve alteração no baço, fígado e rim nos animais submetidos ao uso da *Persea americana* Mill.

## 4-MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Coleta de material vegetal

As folhas da espécie *Persea americana* foram coletadas no período de setembro de 2018, no município de Paço do Lumiar nas coordenadas geográficas 2°28'21.6"S44°09'14.3"W levadas ao Laboratório Experimental do Estudo da Dor (LEED) da UFMA (Figura 2).



Fonte: MENDONÇA, P.G. Setembro 2018

Figura 2: Coleta de folhas de *Persea americana* Mill.

### 4.2- Obtenção do extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* Mill.

Foram coletados 3,445kg de folhas. Estas, depois de limpas foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar em temperatura máxima de 38° C e posteriormente trituradas em moinho de facas (tipo Willey, DeLeo®, EBD-5), resultando em 1,206kg de matéria prima pulverizada. Calculou-se o rendimento total do

extrato, de acordo com a fórmula: Onde: Re = Rendimento total do extrato (%); Pext = Peso do extrato seco (g); Pfolhas = Peso das folhas frescas ou secas (g).

$$Re = \frac{P_{ext}}{P_{folhas}} \times 100$$

O material seco e moído (pó) foi submetido ao processo de extração por maceração com etanol 70%, na proporção de 1:3 (p/v). O processo de maceração ocorreu durante 15 (quinze) dias, sendo em seguida submetido à filtração. Parte da solução extrativa reservada para análise química e o restante submetido à concentração em rota evaporador rotativo, sobre pressão reduzida a 40°C originando o extrato hidroetanólico de *Persea americana* Mill. (EHPA) (FARMACOPÉIA Brasileira, 2010). O rendimento do extrato foi de 35% em relação às folhas secas trituradas. O extrato apresentou coloração verde, cheiro adocicado e características físicos-químicas com aspecto turvo e pH de 5,0.

#### 4.3- Animais

Foram utilizados 30 ratos da linhagem Wistar, espécie *Rattus norvegicus*, adultos, machos com variação de peso entre 200 a 300g fornecidos pelo Biotério Central da UFMA. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Prédio de Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (UFMA), sob condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) a uma temperatura de  $22 \pm 2$  °C e umidade de ar de 40 a 60%, com gaiolas coletivas com 6 animais e ração comercial da marca Labina® e água *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão sob processo número 23115.035401/2018-26.

#### 4.4- Protocolo Experimental

Adotou-se cinco (5) grupos experimentais de animais, todos com seis (6) ratos machos. No dia 1º todos os animais foram avaliados clinicamente e suas amostras de sangue foram coletadas. Uma semana antes da realização das fraturas, os animais assinalados para compor o grupo treinado em natação (grupo FEN e FN), foram adaptados no meio aquático de forma padronizada como mostram as Figuras 3, 4 e 5.





Fonte: MENDONÇA, P.G. Abril 2019.

Figura 3: Primeiro momento de adaptação.



Fonte: MENDONÇA, P.G. Abril 2019.

Figura 4: Segundo momento de adaptação.



Fonte: MENDONÇA, P.G. Abril 2019.

Figura 5: Terceiro momento de adaptação.

Utilizou-se uma caixa d'água medindo 60 cm de diâmetro por 120 cm de profundidade, método adaptado de MARANGON et al. (2002). A temperatura da água foi mantida a  $31\pm 1^{\circ}\text{C}$  do método de HARRI e KUUSELA (1986). A adaptação ocorreu por um período de 7 dias. Primeiro, os animais foram mergulhados em água rasa por 5 minutos durante 2 dias. Posteriormente, no terceiro e quarto dias, o nível da água foi aumentado e o tempo de permanência (GOBATTO et al., 2010). Assim, no quinto dia os ratos já estavam nadando por 5 minutos. E no sexto e sétimo dias, nadando por 10 minutos, com propósito de adaptação e para reduzir o estresse do animal decorrentes do treinamento físico. Vejamos mais claramente a repartição dos animais por grupo:

- **Grupo S:** Usado para fins comparativos e não sofreu nenhum tipo de intervenção.
- **Grupo FE:** Fratura induzida e administração do EHPA por gavagem oral.
- **Grupo FEN:** Fratura induzida, administração do EHPA por gavagem oral e prática de atividade física natação diariamente por 30 minutos.
- **Grupo FN:** Fratura induzida, prática de atividade física natação por 30 minutos.
- **Grupo F:** Fratura induzida, não foi administrado EHPA e nem prática de atividade física natação.

Este foi o delineamento experimental do projeto, segue abaixo ilustração para facilitar o entendimento (Figura 6).

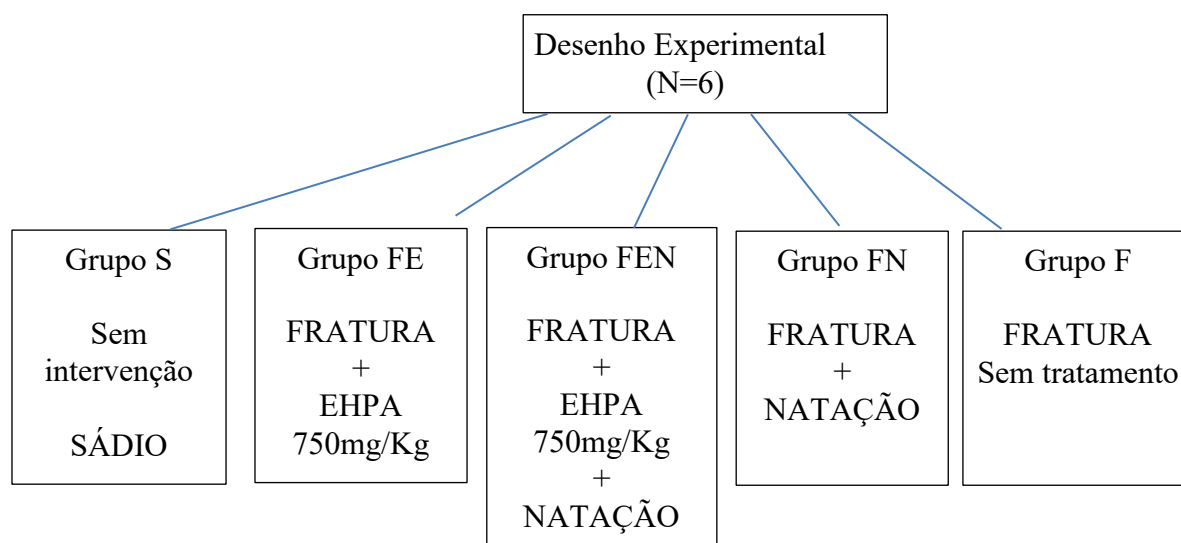


Figura 6: Fluxograma do delineamento experimental

Os grupos FE, FEN, FN e grupo F no dia 0 foram anestesiados com Ketamina 90 mg/kg e Xilazina 10 mg/Kg de peso intraperitoneal para procedimento de fratura (UFRGS, 2016). No mesmo dia, foi iniciada a administração por gavagem via oral do extrato (EHPA) na dosagem de 750mg/kg, o que se repetiu diariamente por 4 (quatro) semanas. A partir do dia 2 – ou seja, no segundo dia pós-fratura – apenas os animais do grupo FEN e FN foram submetidos ao meio aquático por 30 minutos diariamente sendo avaliadas clinicamente durante as quatro semanas. A prática de exercício visava restaurar a movimentação articular adjacente, fortalecendo tecidos moles próximos à fratura, levando a uma maior resistência óssea, protocolo apresentado na Figura 7.

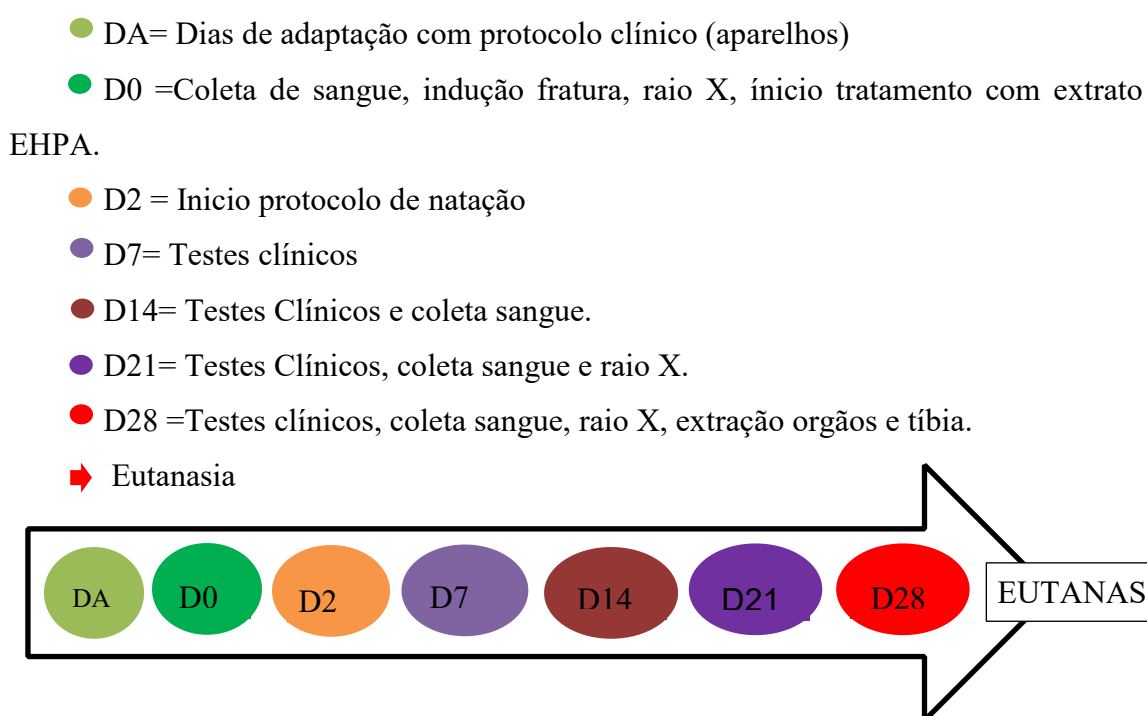


Figura 7: Esquema representativo do delineamento experimental. Imagem ilustrativa do protocolo experimental, com detalhamento dos períodos de adaptação e eutanasia.

Os animais dos grupos FE e F sem exercício tiveram suas atividades limitadas à movimentação espontânea dentro da gaiola. Após 4 semanas de tratamento foram eutanasiados com doses excessivas de Ketamina 90mg/kg e Xilazina 10mg/Kg intraperitoneal, na dose de 3:1. Foram retiradas as tíbias por meio da desarticulação do fêmur para avaliação histológica.

A comparação de consolidação de fraturas experimentais exige similaridade, o que se procurou obter neste estudo. Os animais não foram imobilizados, ficando livres para deambular conforme o membro posterior permita. As fraturas experimentais nas

tíbias de ratos atingem a fase de ossificação em torno da quarta semana de evolução, quando já demonstram evidências osteogênicas de consolidação (UDUPA; PRASAD 1963).

Logo após procedimento de fratura, foi realizada radiografia dos animais com o objetivo de comprovar as adequações da fratura. Percebe-se que todas as fraturas mostram homogeneidade no corte, Figura 8.



Fonte: MENDONÇA, P.G. Abril 2019.

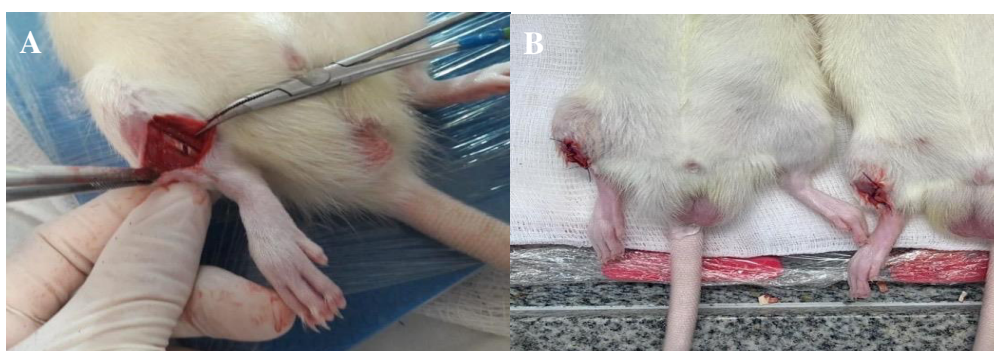
Figura 8: Imagens radiográficas após indução das fraturas.

#### 4.5-Técnica cirúrgica para confecção da fratura

Cuidados pré-anestésicos importantes foram avaliados, tais como a não realização de jejum sólido e hídrico (roedores não vomitam) e o cálculo adequado da dose e do volume dos fármacos a serem administrados em relação ao peso corporal de cada animal (FISH et al., 2009). Com relação à analgesia pré-operatória-fratura, optamos pela preemptiva, que visa bloquear ou reduzir a dor subsequente a estímulos dolorosos, pois evita o estabelecimento da sensibilização central pela incisão cirúrgica e pelo processo inflamatório pós-operatório. O fármaco de escolha é o analgésico Flunixin meglumine 2,5mg/kg SC de 12/12horas por 72horas. (GAERTNER et al., 2008).

Após certificação do plano anestésico, foi realizada a tricotomia do membro pélvico direito e a antissepsia com solução alcoólica de clorexidina a 10% (MAYSA 2016). A fratura ocorreu na região diafisária da tíbia, membro pélvico inferior direito. Foi confeccionado por uma microretífica, aparelho excelente para pequenos cortes, furos e desbastes.

A fratura foi realizada no terço médio da tíbia direita de forma aberta, com uma velocidade de 15.000 rotações por minuto. Para esse procedimento foi utilizada uma broca fina de 0.5mm. Durante todo processo irrigamos manualmente com soro fisiológico. O membro inferior direito foi apoiado na bancada e após um deslocamento da musculatura e partes moles de maneira manual, no seu terço médio o osso recebeu o corte (Figura 9-A). A incisão na região frontal da pata foi suturada com fios absorvíveis e foi aplicado iodo para impedir autofagia (Figura 9-B). Este modelo de fratura é adaptado, tem a vantagem de mimetizar as fraturas ósseas clinicamente (URABE et al., 2003), (OGASAWARA et al., 2008). Após alguns testes pilotos, optamos por usar a microretífica, aparelho de fácil manuseio.



Fonte: MENDONÇA, P.G. Abril 2019

Figura 9: A-Imagem de fratura realizada em um dos animais. B-Imagem do membro suturado.

Foi criado um defeito crítico no canal medular da diáfise média, entre a linha áspera e o terceiro trocânter, com aproximadamente 5mm de comprimento por 2,5 mm de largura e com profundidade suficiente até chegar ao canal medular.

Os animais se recuperaram da anestesia em cama térmica para evitar a perda de temperatura corpórea e receberam dipirona (80μL de uma diluição 1:5 em solução estéril de 0,9% de NaCl), por via subcutânea (Figura 10).



Fonte: MENDONÇA, P.G. Abril 2019.

Figura 10: Os animais se recuperando da anestesia, antes de serem colocados nas gaiolas. Uma vez recuperados, os animais foram mantidos em gaiolas, de acordo com as

normas técnicas do biotério. Segundo a DBCA (Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais) em Atividades de Ensino, o período pós-operatório deve obrigatoriamente proporcionar conforto e analgesia para o animal sempre que a dor não for o escopo do protocolo experimental. Demos atenção à hidratação, alimentação, higiene, temperatura e ao controle de infecções (DBCA, 2016).

A dor no pós-operatório continua sendo importante e será mais fácil de ser manejada nestes animais que recebem analgesia preemptiva. Foi controlada com o uso de analgésico, Flunixin meglumine (2,5mg/kg SC 12/12horas após a avaliação dos sinais clínicos que indicavam dor. Tais sinais como:

- Aparência anormal: referente a pelo bagunçado, piloereção (pelos arrepiados), cifose vertebral (postura arqueada), cromodacriorreia (secreção avermelhada ao redor dos olhos e narinas);
- Alteração comportamental: diminuição do comportamento exploratório (padrão motor) e do consumo de alimento e ingestão de água (padrão alimentar);
- Proteção: alteração postural para evitar que a região do corpo que dói seja manipulada ou toque a caixa de alojamento;
- Auto-mutilação: cuidado excessivo com alguma região do corpo (lambedura; mordidas, coceiras);
- Vocalização: quando a área de algia (dolorosa) é manipulada/palpada; mudanças no comportamento da espécie: espasmos e/ou contrações musculares, agressividade, letargia, ansiedade (PATRICK; VILLANO 2013).

Após avaliação de todos estes parâmetros e tendo observado quaisquer alterações que indiquem dor e/ou distresse potencial, sofrimento - sem perder a qualidade dos dados obtidos -, o animal deve ser excluído da pesquisa e submetido à eutanásia. Este é um ponto importante para impedir ou diminuir o sofrimento desnecessário do animal (ARAUJO 2015). Não houve a necessidade de eutanásia de nenhum animal.

As complicações dessas fraturas podem ser sistêmicas e/ou locais, sendo a infecção uma das mais temíveis neste caso há necessidade de antibioticoterapia. A ciprofloxacina é um dos antibióticos usados tanto de forma profilática quando terapêutica nestes casos (FERNANDES; REIS 2004).

O cloridrato de ciprofloxacino é amplamente utilizado, pertence à família das fluoroquinolonas, atua em um largo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, incluindo infecções causadas por *Staphylococcus aureus*.

Age através do bloqueio de DNA girase, que é essencial para a reprodução do DNA da bactéria. Apresenta boa biodisponibilidade oral e penetração óssea, o que torna seu uso bastante frequente no tratamento da osteomielite. Foi administrado nos animais na dose de 10mg/kg por via intramuscular a cada 12 horas, durante 72 horas (OLIPHANT; GREEN 2005).

### **5- Análise por Cromatografia Líquida Acoplada por Espectrometria de Massas**

O EHPA foi analisado por cromatógrafo líquido (LC-20AD Shimadzu) em uma coluna Phenomenex Luna C-18 (250x4,6mm-5um). As fases móveis consistiram em água ultrapura contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B). O gradiente linear a seguir foi aplicado: 0 min, 5% de B; 1 a 60 minutos, 5 a 100% de B; 60-70 min, 100% de B no fluxo de 1 mL/min.

O HPLC foi acoplado a um espectrômetro de massa (Amazon Speed ETD, Bruker, Massachusetts, EUA) equipado com ionização por electropulverização (ESI) e uma analisador do tipo armadilha de íons (IT) nos modos negativo e positivo, nas seguintes condições: tensão capilar de 4,5kV, temperatura capilar 325° C, fluxo de gás de arraste (N<sub>2</sub>) 12L/min, pressão do nebulizador de nitrogênio a 27psi. O intervalo de aquisição foi de m/z 100 a 1500, com dois ou mais eventos.

### **6- Atividade enzimática da ciclooxigenase 1 (COX 1) e ciclooxigenase 2 (COX 2)**

O ensaio foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (*Cox Colorimetric Inhibitor Screening - Cayman chemical®*). A placa de 96 poços foi inicialmente identificada, sendo os testes de inibição realizados em triplicata, para cada concentração testada (2, 10 e 50 ug/mL) do EHPA e para os controles da reação: **BW** – controle sem enzima; **A**- com enzima somente, sem inibidor. Os 3 poços “**BW**” receberam 160 µL do tampão Tris-HCl, 10 µL do Heme e 10 µL do solvente – etanol 70%, utilizados para diluir as amostras. Os 3 poços “**A**” receberam 150 µL do tampão Tris-HCl, 10 µL do Heme, 10 µL da enzima (COX-1 ou Cox-2) e 10 µL do solvente – etanol 70%. Os poços com o EHPA receberam 150 µL do tampão Tris-HCl, 10 µL do heme, 10 µL da enzima (COX-1 ou Cox-2) e 10 µL da amostra do EHPA diluído com solvente – etanol 70%, nas concentrações 2, 10 e 50 ug/mL. Após a mistura de todos estes reagentes em cada poço, a placa foi agitada cuidadosamente por alguns segundos, sendo incubada por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 µL da solução com substrato colorimétrico, em cada poço da placa e após isso, foram adicionados 20 µL do

ácido araquidônico, substrato da reação enzimática, catalisada pela COX. A placa foi novamente agitada, e incubada por 2 minutos a 25°C e foi lida em leitor Elisa (EPOCH) e então sendo lida a 590 nm.

## 7-Análise bioquímica do sangue

Antes do início do tratamento no D0 e no D28 após tratamento com EHPA foi coletado amostras de sangue. O sangue coletado foi colocado em tubos de plástico de 4ml da marca BD com EDTA a vácuo para realização do hemograma completo e tubos Gel a vácuo de 3,5ml com gel separador e ativador de coagulo para dosagens bioquímicas. Submetidos a centrifugação para obtenção do soro, sendo em seguida separados e acondicionados em fracos tipo *Eppendorf*®. Os parâmetros bioquímicos foram determinados em analisador semiautomático Bioplus® utilizando-se kits comerciais da LABTEST. Foram determinados por métodos enzimáticos: glicose, colesterol total, triglicerídeos, uréia, creatinina, ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase) e fosfatase alcalina. No hemograma completo foram utilizados dados dos leucócitos, linfócitos e hemoglobina.

## 8.0- Avaliação Clínica

### 8.1- Avaliação de Atividade Motora/Deambulação Forçada (*RotaRod Test*)

Os animais foram colocados no Rotarod (modelo IITC Life Science, Califórnia, Estados Unidos) Figura 12, na velocidade de 16 rpm por um período de tempo de 300 segundos nos D7, D14, D21 e D28. A utilização do membro afetado foi avaliada pela deambulação forçada. O uso do membro pélvico inferior direito foi graduado em uma escala numérica que varia de 5 a 1, em que: 5= uso normal do membro; 4= claudicação leve; 3= claudicação grave; 2= intermitente desuso do membro afetado; 1= completo desuso do membro afetado (KALFF *et al.*,2010).



Fonte: MENDONÇA, P.G. Abril 2019.

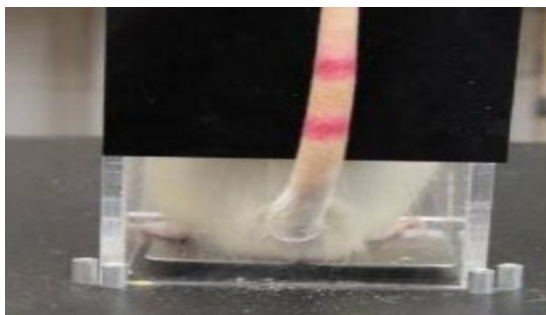
Figura 12: Animal em aparelho RotaRod.



## 8.2- Teste de Incapacitância/ Distribuição do Peso nos membros traseiros (*Weight Bearing*)

Os animais foram colocados em uma câmara de vidro angulada e posicionados, de modo que cada pata traseira repousasse sobre plataformas diferentes. O peso exercido sobre cada pata traseira (mensurado em gramas) foi avaliado em um período de cinco segundos. A aferição final da distribuição do peso foi dada por uma média de três aferições.

Esse teste foi realizado nos D7, D14, D21 e D28. Os animais foram colocados em uma câmara de vidro angulada e posicionados (Figura 13), de modo que cada membro traseiro repouse sobre plataformas diferentes. O peso exercido sobre cada membro traseiro (mensurado em gramas) será avaliado em um período de cinco segundos. A aferição final da distribuição do peso será dada por uma média de três aferições (SCHOTT et al. 1994).



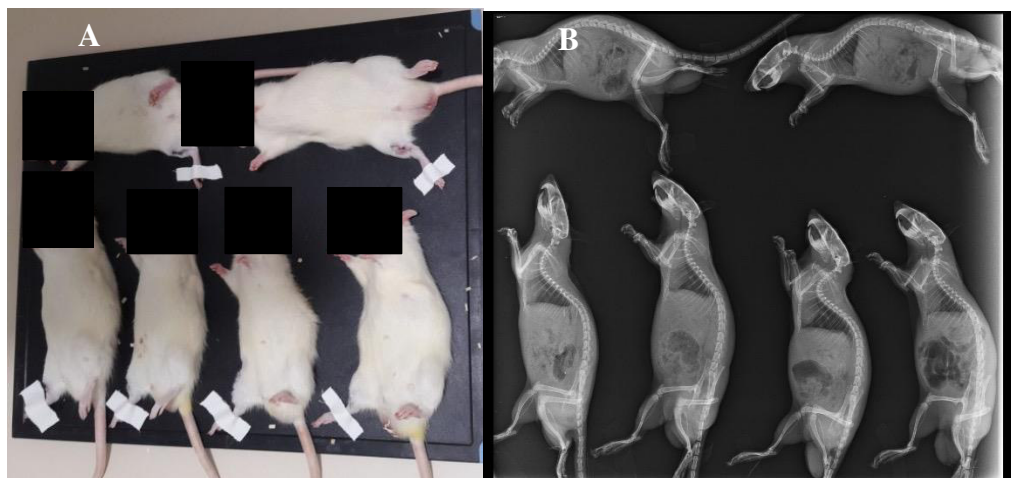
Fonte: MENDONÇA, P.G. Abril 2019.

Figura 13: Animal em aparelho Weight Bearing.

## 9-Análise radiográfica

As radiografias do membro inferior dos animais foram obtidas através de aparelho de raios-X PHILIPS Medical Systems Ltda, unidade seladora Rotax, KVP 125, #Série PADXJL.10.001. Equipamento de raios-X com proteção radiológica de acordo com a NBR IEC 60601-1-3-2001. Modelo KL.90.30/50. Reveladora DIRECT DIGITIZER, Model DRYPRO SIGMA S/N 002650, P/N 9G9001, REF A4A9. As imagens foram realizadas no D7 após a fratura e nos D21 e D28 para acompanhamento. Os animais foram submetidos à anestesia superficial por meio da combinação Ketamina e Xilazina nas doses (1:1; 0,05ml/100g), respectivamente. No D28 já haviam sido eutanasiados e apenas o membro foi levado para raio x. Posicionados em decúbito

ventral com membros posteriores em abdução e flexão de quadril e joelhos (90°) sobre o chassi a uma distância de 115cm do foco de acordo com as Figuras 11-A e 11-B.



Fonte: MENDONÇA, P.G. Abril 2019.

Figura 11-A e 11-B: Posicionamento dos animais no Raio X.

### 10.0-Análise histológica do tecido ósseo

Após o animal eutanasiado, a tíbia foi extraída e fixada em formol a 10% por 24 horas e imerso em solução descalcificante por 15 dias, seguindo-se do processamento por métodos de rotina até a inclusão em blocos de parafina. Os compartimentos foram separados longitudinalmente, e encaminhados para preparação histológica rotineira por hematoxilina-eosina. Os cortes teciduais foram colocados em moldes retangulares, formando blocos, que foram subsequentemente seccionados por navalhas de aço do micrótomo de 4  $\mu$ m. Utilizou-se o método de Allen et al., 1980 para efetuar a classificação da consolidação, conforme demonstra a tabela 2.

**Tabela 2:** Descrição dos parâmetros para classificação da fase de consolidação da fratura conforme descrição de Allen et al., 1980.

| Estágio de Achados histológicos reparo ósseo |                                                                                                |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Grau 4</b>                                | União óssea completa                                                                           |
| <b>Grau 3</b>                                | União óssea incompleta com presença de restos de cartilagem no calo                            |
| <b>Grau 2</b>                                | União cartilaginosa completa com presença de ponte cartilaginosa unindo as extremidades ósseas |

|               |                                                                                                  |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Grau 1</b> | União cartilaginosa incompleta com presença de restos de tecido fibroso e de placa cartilaginosa |
| <b>Grau 0</b> | Pseudartrose                                                                                     |

Fonte: Adaptada de Mainardes KC et al., Effect of diabetes associated to aging in the consolidation of fractures in the tibia of rats. Rev Bras Ortop. 2007;42(3):55-6.

## 11-Análise estatística

A comparação das médias de diferentes grupos experimentais foi realizada pelo teste *t de Student* ou análise de biviância (*TWO-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Tukey*. Na avaliação de duas fontes de variabilidade, foi utilizado análise de variância bivariada (*TWO-way – ANOVA*). O valor de  $p < 0,05$  foi considerado como indicativo de significância e os dados obtidos foram analisados através do software Graph Pad Instal® (Graph Pad software 7.0, San Diego, CA).

## 12- Resultados

### 12.1-Análise por Cromatografia Líquida Acoplada por Espectrometria de Massas

A análise por espectrometria de massas em modo positivo e negativo, mostrou a presença de 24 compostos no extrato hidroetanólico de folhas de *Persea americana* Mill., os quais foram identificados por desreplicação, comparando as massas, tempos de retenção e fragmentos obtidos em espectrometria de massa, com a literatura (Tabela 3) e hidroetanólica da *Persea americana* Mill. (Figura 15) e as estruturas químicas na figura 16.

**Table 3:** Constituintes químicos identificados no extrato hidroetanólico de *Persea americana* Mill., por cromatografia líquida acoplada á espectrometria de massas (LC-MS)

| Número | TR <sup>a</sup> | [M+H] <sup>+</sup> <sup>b</sup><br>[M+Na] <sup>+</sup> <sup>c</sup> | Fragmentos    | Substâncias Propostas        |
|--------|-----------------|---------------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------|
| 1      | 28              | 385                                                                 | 193, 157, 139 | Ácido acetil hexosil caféico |
| 2      | 17.1            | 449                                                                 | 303, 285, 257 | Orientina                    |
| 3      | 16.3            | 625                                                                 | 479, 317      | Verbascosídeo                |
| 4      | 24.8            | 308                                                                 | 291, 236      | n.i.*                        |
| 5      | 25.2            | 318                                                                 | 256           | Crinamidina                  |

|    |      |      |              |                     |
|----|------|------|--------------|---------------------|
| 6  | 33.1 | 439* | 416,257, 147 | Pulmatina           |
| 7  | 36.1 | 353  | 261, 163     | n.i                 |
| 8  | 36.1 | 569  | 285, 185     | Luteina             |
| 9  | 37.8 | 701  | 539          | n.i                 |
| 10 | 40.2 | 353  | 335, 261     | n.i                 |
| 11 | 42.0 | 573  | 287, 269     | n.i                 |
| 12 | 46.3 | 577  | 289, 253     | Dimero de catequina |

| Número | TR   | [M-H] <sup>-d</sup> | Fragmentos    | Substâncias Propostas                       |
|--------|------|---------------------|---------------|---------------------------------------------|
| 1a     | 3.7  | 317                 | 191, 165      | Derivado de ácido químico                   |
| 2a     | 7.3  | 583                 | 537, 315      | n.i                                         |
| 3a     | 7.3  | 315                 | 153           | Isorhamentina                               |
| 4a     | 8.6  | 583                 | 537           | n.i                                         |
| 5a     | 10.3 | 563                 | 281           | Vicenina 1                                  |
| 6a     | 12.8 | 563                 | 517, 191      | Apigenina-6,8-C pentosideo hexosideo        |
| 7a     | 14.7 | 609                 | 301           | Rutina                                      |
| 8a     | 17.1 | 447                 | 301           | Quercetrina                                 |
| 9a     | 18.9 | 431                 | 281, 167      | Vitexina                                    |
| 10a    | 21.6 | 593                 | 547, 447, 285 | kaempferol 7-O-neohesperidosideo            |
| 11a    | 31.5 | 739                 | 593, 301      | Apigenina-C-hexosideo-O-rhamnosil-hexosideo |
| 12a    | 39.4 | 1027                | 983, 773, 513 | Derivado de Procianidina                    |

<sup>a</sup>RT: Tempo de retenção

<sup>b</sup>[M+H]<sup>+</sup>: modo positivo

<sup>c</sup>[M+Na]<sup>+</sup>: aducto de Sódio

<sup>d</sup>[M-H]<sup>-</sup>: modo negative

\*n.i: não identificado

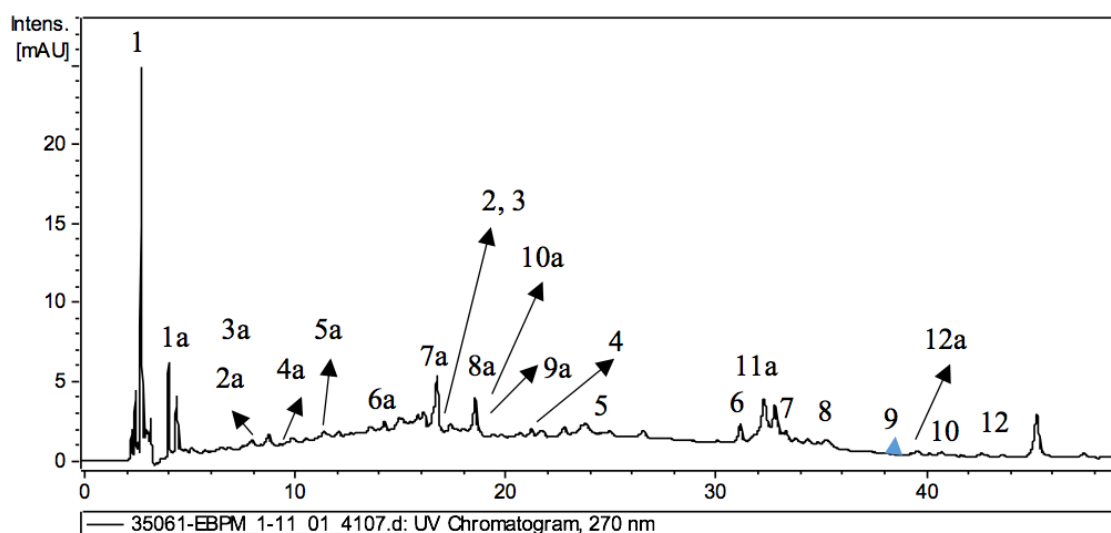


Figura 15: Cromatograma de extrato hidroetanólico de *Persea americana* Mill.

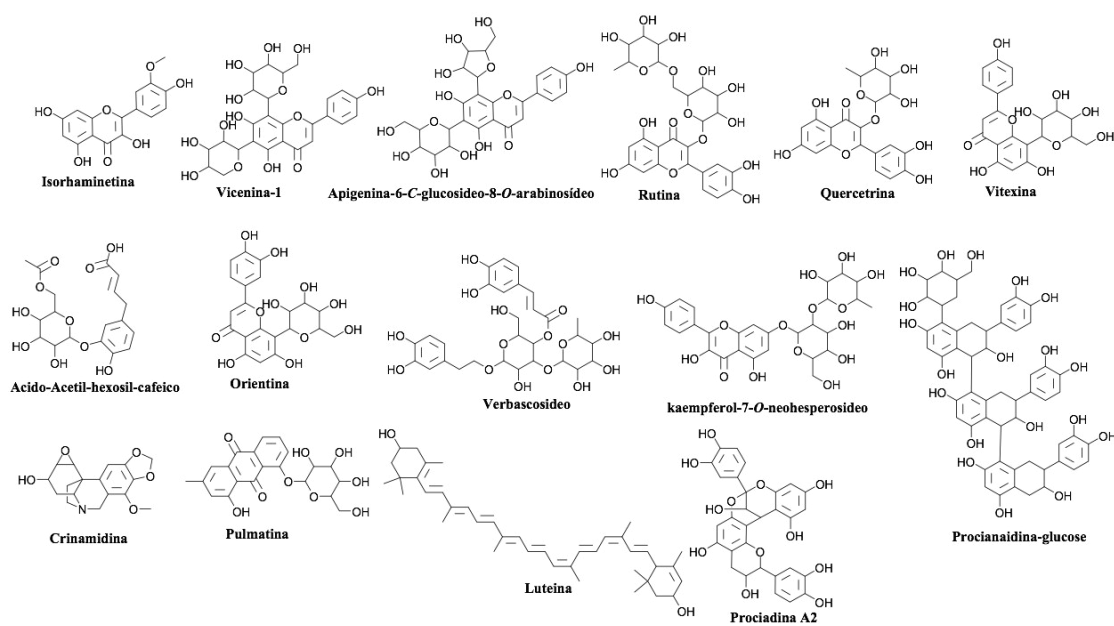


Figura 16: Estruturas químicas dos compostos identificados no Extrato hidroetanólico de *Persia americana* Mill.

## 12.2- Determinação da atividade enzimática da ciclooxigenase 1 (COX 1) e ciclooxigenase 2 (COX 2)

Os resultados do ensaio mostraram que o EHPA não inibiu a COX-1 em nenhuma das concentrações testadas. Porém inibiu em até mais de 55% a atividade da COX-2 na concentração de 50µg/mL. Os resultados também evidenciaram que a eficiência do extrato na COX-2 aumentou, conforme a concentração do extrato foi aumentada. Na concentração de 2µL o extrato inibiu em 37,94% e na concentração de 10µg/mL o extrato inibiu em 44,93 %, conforme a Figura 14.

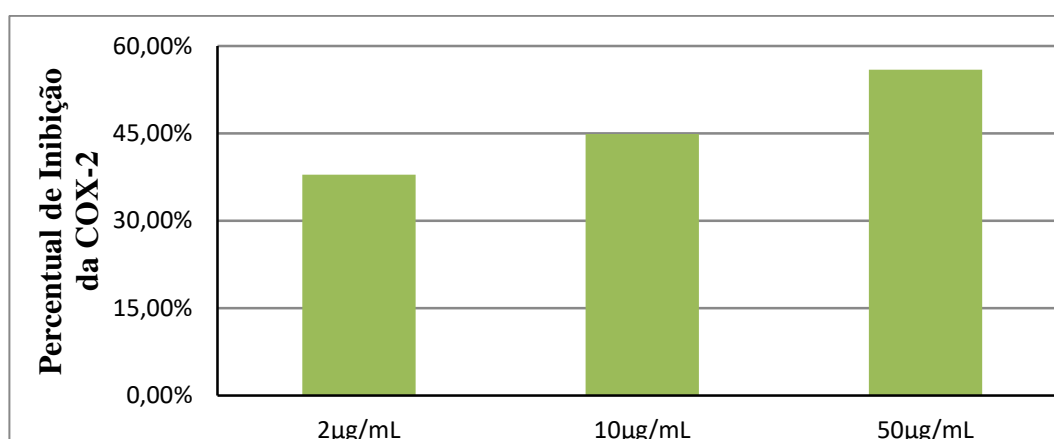


Figura 14: Percentual de inibição da Cicloxigenase (COX-2) *in vitro*, induzido pelo EHPA, testado nas concentrações de 2µg/mL, 10µg/mL e 50µg/mL.

## 13-Bioquímica

Os resultados dos parâmetros bioquímicos no soro dos grupos experimentais estão apresentados na tabela 4. A análise foi realizada pela média dos valores dos grupos e comparada com a média dos animais sadios (LIMA et al., 2014). Não foram identificadas alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos entre os grupos que não receberam EHPA versus animais tratados com EHPA 750 mg/kg.

**Tabela 4.** Resultado dos Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos e valores de referências.

| EXAMES     | REFERÊNCIAS<br>LIMA et al., 2014 | SADIO     | FRT+ EXT    | FRT+EXT+NAT |
|------------|----------------------------------|-----------|-------------|-------------|
| Glic mg/dl | 138,72±30,17                     | 143,0±3,0 | 133,33±3,06 | 133,7±2,52  |
| ColT mg/dl | 60,68±6,51                       | 61,3±2,1  | 52,0±2,0    | 54,3±2,52   |
| Trig md/dl | 46,87±18,73                      | 50,3±2,5  | 48,0±2,0    | 45,3±2,08   |

|                              |              |            |             |            |
|------------------------------|--------------|------------|-------------|------------|
| <b>CR mg/dl</b>              | 0,58±0,24    | 0,6 ±0,1   | 0,63±0,06   | 0,6±0,10   |
| <b>UR mg/dl</b>              | 39,97±6,78   | 43,0 ± 2,0 | 43,0±3,0    | 44,0±1,0   |
| <b>ALP U/I</b>               | 91,63±28,70  | 94,0±3,6   | 92,33±2,52  | 90,3±1,53  |
| <b>AST U/I</b>               | 131,33±43,98 | 131,3±2,5  | 135,33±3,06 | 137,3±2,08 |
| <b>ALT U/I</b>               | 57,55±11,95  | 61,3±2,1   | 58,0±2,0    | 58,7±1,53  |
| <b>Hb g/dl</b>               | 15,00±1,45   | 15,2±0,2   | 15,50±0,46  | 15,6±0,20  |
| <b>Leuc 10<sup>9</sup>/l</b> | 7,63±2,37    | 7,5±0,1    | 7,43±0,15   | 7,6±0,10   |
| <b>Linf %</b>                | 67,36±15,31  | 68±1,0     | 64,0±1,0    | 65,0±1,0   |

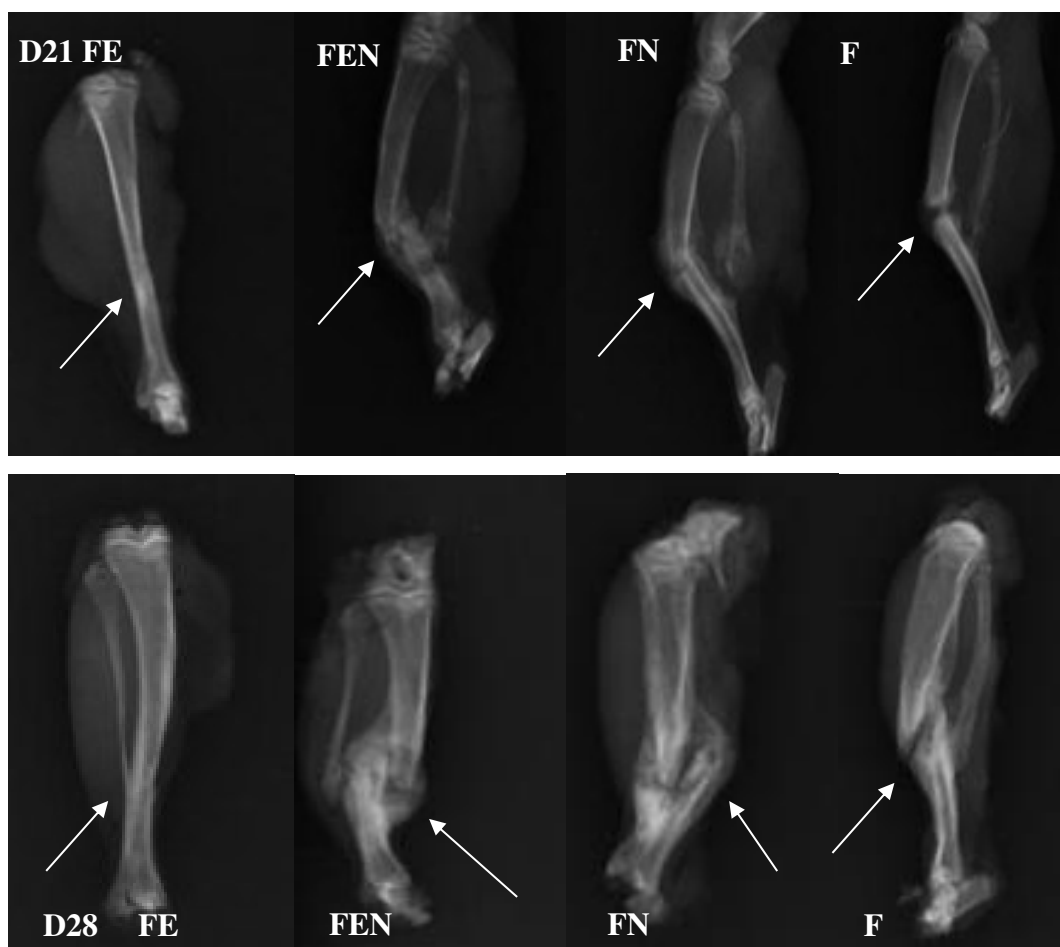
Fonte: Adaptada de LIMA et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes, comparados com animais da Universidade Federal do Maranhão neste experimento. SCIENTIA PLENA. VOL. 10, NUM. 03 2014.

#### 14-Análise das alterações radiológicas na cicatrização das fraturas

As radiografias obtidas foram utilizadas para avaliação da consolidação óssea de acordo com a classificação proposta por Oryan (ORYAN et al.,2015). Todas as fraturas induzidas foram realizadas no terço médio da tíbia. Não foram observados sinais lesão cutânea, necrose e/ou edema grave no local da fratura.

Na terceira semana após tratamento no D21, foi realizada eutanásia e dissecação tibial em um animal de cada grupo. Essa análise possibilitou evidenciar que os animais do grupo FE já apresentavam formação óssea de acordo com os critérios de Oryan, sem sinais de calo mole e /ou deformidades. A linha de fratura sinuosa dificilmente foi visualizada. No grupo FEN foi identificado sinal de fratura com presença de um pequeno calo mole. O grupo FN não demonstrou sinais consolidação, sendo evidente a linha da fratura sinuosa. O grupo fratura também apresenta linha sinuosa e mais espessa de não consolidação.

No D28 as imagens radiográficas apontam total consolidação óssea, sem sinais de deformidade óssea, ou pseudoartrose no grupo FE confirmando os dados do D21. Já o grupo fratura, apresenta fratura total de membro com pseudoartrose e não demonstra sinais de consolidação (espaço). Percebe-se que os grupos FEN e o grupo FN apresentam deformidade óssea e formação de calo ósseo. Na Figura 17 apresentam-se imagens de radiografias.



**Figura 17:** Radiografias de fratura de tíbias em ratos Wistar em diferentes semanas.

Radiografias de tíbias de ratos Wistar. Apresentam-se os grupos (FE), (FEN), (FN) e (F) no D21 e D28. No D21 o momento radiográfico apresenta: grupo FE com consolidação óssea no osso da tíbia, sem má formação. O grupo FEN apresenta sinais de consolidação e presença de pequeno espaço. O grupo FN permanece com a linha de fratura nítida e um pequeno calo. O grupo F também apresentou fratura completa de membro com linha nítida, mesmo apenas deambulando na gaiola. No D28 os animais do grupo FE permanecem com fratura consolidada e união óssea sem deformidades. O grupo FEN apresenta calo bem delimitado, porém deformidade presente. Grupo FN, deformidade e presença de calo ósseo. Grupo F apresenta linha de fratura nítida não consolidada.

## 15-Avaliação Clínica

### 15.1- Avaliação de Atividade Motora/Deambulação Forçada

O teste comportamental da avaliação da atividade motora considera uma velocidade fixa de 16rpm por 300 segundos. Avaliou-se a deambulação dos animais através de um score numérico descrito no item 9.1. Esta avaliação mostrou inicialmente que a indução da fratura foi eficaz como apresentado na Figura 18.

A análise do D7 demonstrou que a indução da fratura foi eficiente, pois houve redução acentuada com significância de  $p^{****} < 0,0001$  entre os grupos. Após a aplicação do tratamento e do exercício foi possível observar que no D7 o grupo FE versus FEN possui significância de  $p < 0,0001$ . No D7 percebemos ainda que os animais



do grupo FEN apresentam uma melhora na deambulação do membro fraturado. Acredita-se que a prática de atividade física por uma semana antes do protocolo de fratura de certa forma fortaleceu a musculatura e ossos destes animais.

No D14, quando comparamos grupo S versus os demais à significância de  $p^{****} < 0,0001$ . Quando se compara o efeito do extrato e do exercício físico, é possível observar que os grupos FE versus o FN a significância é  $p^{ooo} < 0,0001$ , o grupo FE se mantém melhor. Assim como quando se compara os grupos que fizeram uso do extrato e atividade física se mantêm melhores que o grupo fratura.

No D21, quando comparamos o grupo S versus os demais, a significância de  $p^{****} < 0,0001$ . Já no grupo FE versus FN e F significância de  $p^{ooo} < 0,0001$ , demonstrando que os animais que utilizam o extrato se mantêm melhor clinicamente. Isto se repete quando comparamos o grupo FEN com FN e F onde  $p^{####} < 0,0001$ .

No D28 o grupo tratado com extrato e natação (FEN) se mantém melhor que o grupo que apenas fez atividade física e o grupo sem tratamento onde  $p^{aaaa} < 0,0001$ . Percebe-se que durante o D7, D14, D21 o grupo fratura não demonstra melhora. Apenas os demais grupos demonstram melhoras a partir do D14.

Com relação aos scores estabelecidos de acordo com classificação de Kalff percebe-se que após a indução todos os grupos fratura apresentam valor 1, completo desuso da pata. No decorrer dos dias, o extrato começa fazer efeito e o processo inflamatório é reduzido e os animais começam apresentar melhora significativa no D14, nesta com score 4, claudicação leve. Porém o grupo fratura se mantém até D21 em completo desuso do membro afetado. No D21 os grupos extrato já apresentam melhora visual significativa, com score de 5, uso normal do membro, que se mantém até término do experimento.

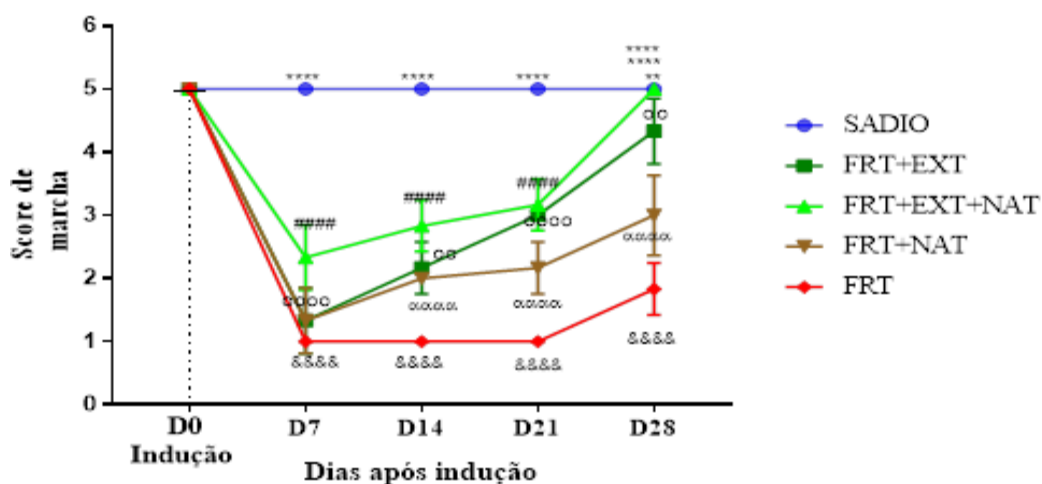


Figura 18- Efeito da administração do EHPA no teste de Atividade Motora/Deambulação Forçada (*RotaRod Test*), em modelo de fratura de tíbia de rato. As linhas representam média com  $n = 6$  por grupo e a análise estatística foi realizada por Two way ANOVA/Tukey. A indução da fratura foi realizada no D0, Após 7, 14, 21 e 28 dias da indução, a deambulação forçada dos animais foi mensurada para avaliação de incapacidade leve, grave ou total do membro. No D7 os animais do grupo FEN e grupo FE recebem (EHPA 750mg/Kg/v.o/28dias). Os dados são representados em média  $\pm$  desvio padrão das médias. O grupo sadio é representado por animais sem fratura e sem tratamento. \*\*\*\*, #####, &&&&, °°°° representa diferenças significativas por grupos.

### 15.2-Teste de Incapacitância/ Distribuição do Peso nos membros traseiros.

O teste comportamental da avaliação de incapacidade funcional considera a diferença de peso no membro direito dos animais, ou seja, a diferença entre o membro ipsilateral e contralateral em relação à fratura. Os valores estão expressos em porcentagem (%) e os maiores valores no membro contralateral indica déficit de sustentação de peso no membro ipsilateral confirmando a fratura no D7, primeiro dia de teste após a indução.

A análise do D7 demonstrou que a indução da fratura foi eficiente, pois houve redução acentuada com significância de  $p^{****} < 0,0001$  entre o grupo sadio versus demais. Ainda no D7 vale ressaltar que o grupo FE versus FEN possui significância de  $p^{°°°°} < 0,0001$ . É importante salientar que neste grupo FEN os animais visivelmente demonstram mais conformo ao apoiar o membro direito induzido, a prática da atividade física ajudou no desenvolvimento da musculatura e sustentação do membro.

No D14, quando comparamos grupo S versus os grupos sem atividade física e sem tratamento com extrato  $p^{****} < 0,0001$ . Se tratando dos grupos extrato com e sem atividade física ambos se mostram próximos do grupo S e com distanciamento grande do grupo FN e F. Assim como quando se compara FEN versus FN e grupo F  $p$  também é  $p^{#####} < 0,0001$ .

No D21 os grupos tratados com extrato, com ou sem prática de atividade física estão próximos, quando comparados com o grupo FN e F com  $p^{°°°°} < 0,0001$ . Neste período existe diferença clínica clara entre grupos tratados com extrato e os demais.

No D28 tempo máximo do tratamento o grupo fratura se mostra sem melhora e com animais ainda em completo desuso da pata e com incapacidade de sustentação. O grupo FN apresenta uma melhora significativa com  $p^{°°°°} < 0,0001$  quando comparado com grupo F. Porém neste grupo a prática de atividade física levou a fratura completa do membro e deformidade na consolidação. Os grupos tratados com extrato e atividade

física se mantêm próximos com significância de  $p<0,0001$ , contudo o grupo FEN apresenta deformidade óssea quando comparado com grupo FE.

Com relação aos padrões estabelecidos por Schott percebe-se que após a indução no D7 todos os grupos fratura apresentam maior peso no membro sadio, com pouquíssima carga na pisada do membro fraturado. No decorrer dos dias, o extrato começa fazer efeito e o processo inflamatório é reduzido e os animais tratados com EHPA começam apresentar melhora significativa no D14. No D21 os grupos tratados sem mantêm muito próximos. No D28 os animais já mostram apoio nos dois membros de maneira equivalente. Porém o grupo fratura permanece sem apoio equivalente dos membros. Sobre peso no membro esquerdo como demonstra a Figura 19.

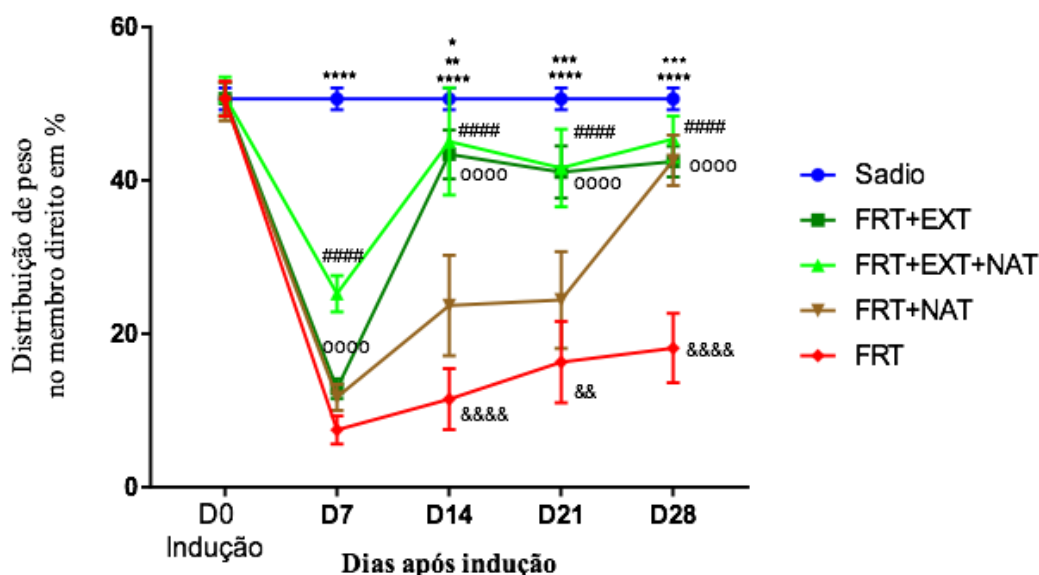


Figura 19: Efeito da administração do EHPA no teste de incapacidade funcional (Weight Bearing) em modelo de fratura de tibia de ratos. As linhas representam média com  $n = 6$  por grupo e a análise estatística foi realizada por Two way ANOVA/Tukey. A indução da fratura foi realizada no D0. Após 7, 14, 21 e 28 dias da indução, a distribuição de peso no membro inferior direito dos animais foi mensurada para avaliação de incapacidade por meio do teste de Suporte de Peso. No D7 os animais do grupo FEN e grupo FE recebem (EHPA 750mg/Kg/v.o/28dias). A prática de atividade física (natação) iniciou-se no D9 para os grupos FEN, e FN. Os dados são representados em média  $\pm$  desvio padrão das médias. O grupo sadio é representado por animais sem fratura e sem tratamento. \*\*\*\*, #####, &&&&, ° ° ° ° representa diferenças significativas por grupos.

## 16-Histologia do tecido ósseo

A avaliação histopatológica, figura 20, utilizando o sistema de classificação da fase de consolidação da fratura é feita conforme Allen ver item 10. O grupo sadio obteve a classificação 4, haja vista que não houve fratura, existe uma união óssea

completa. A imagem do grupo FE mostram que o tratamento com EHPA na dose 750mg/kg foi capaz de consolidar a fratura com união óssea completa, classificação 4 (osso-medula-osso), sem deformidade. O grupo FEN também apresenta consolidação completa, porém à união cartilaginosa demonstra presença de ponte cartilaginosa unindo as extremidades ósseas

O grupo FN classificado com união cartilaginosa incompleta com presença de restos de tecido fibroso, e de placa cartilaginosa, classificação 1 (seta representa tecido conjuntivo cartilaginoso). E o grupo F, classificação 0, pseudoartrose.

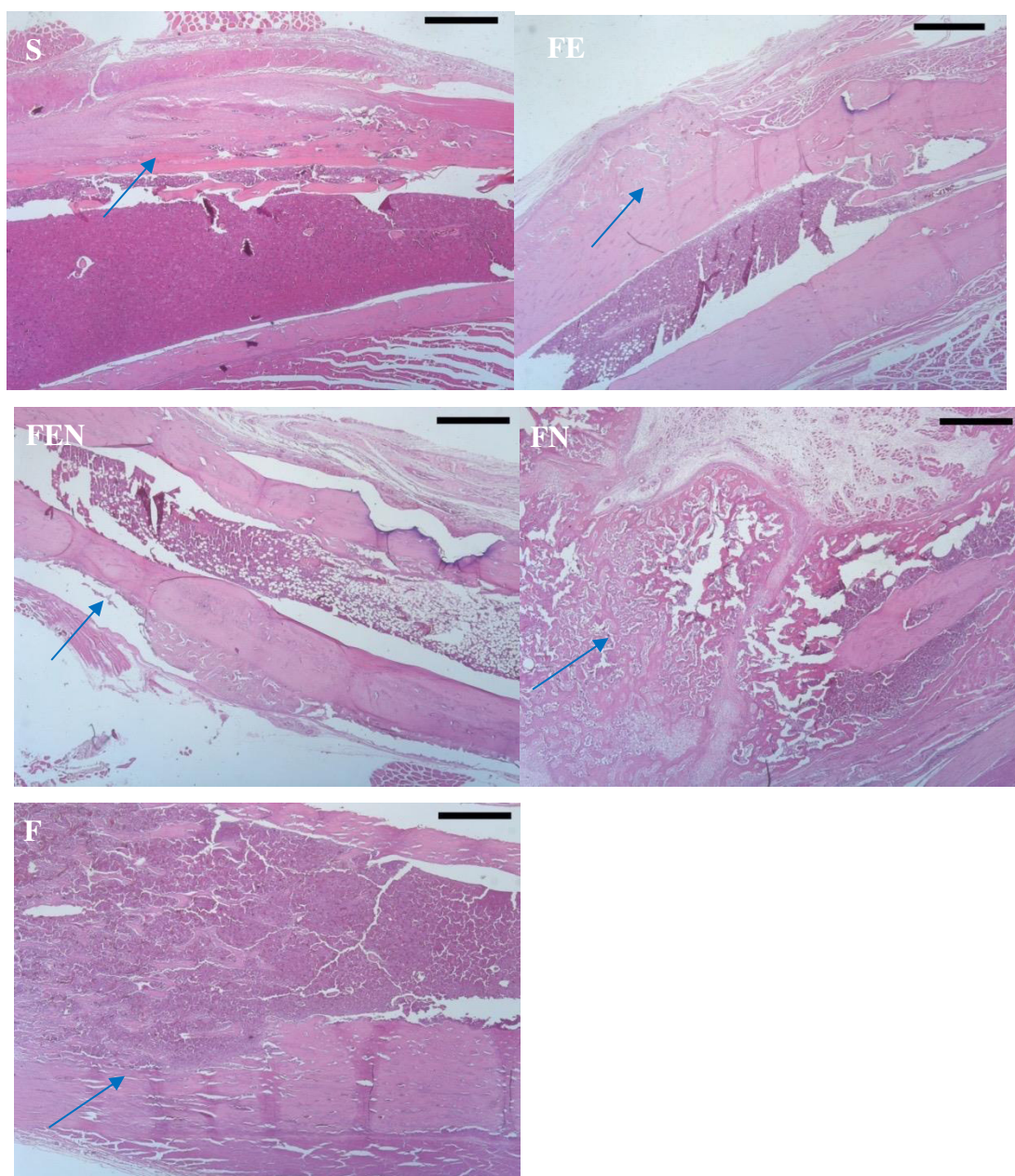


Figura 20: Cortes histológicos exemplares de tíbias demonstrando o grau de consolidação. Seções de ossos/tíbia com diferentes graus de consolidação. Classificadas



usando o sistema de pontuação da fase de consolidação da fratura conforme descrição de Allen. Essa análise foi realizada com tíbias no dia 28 após a indução da fratura e tratamento com EHPA 750mg/kg. Grupo sadio (S), não tratado e não induzido, consolidação normal (Grau 4). Grupo FE, tratado com EHPA 750mg/kg, consolidação normal . (Grau 4). Grupo FEN, tratado com EHPA 750mg/kg e prática de natação (Grau 2). Grupo FN ( Grau 1) e grupo F, sem tratamento medicamentoso e sem pratica de atividade física (Grau 0), 100X. HE.

As análises histopatológicas do baço, fígado e rim não mostraram alterações patológicas, na dose administrada do EHPA (750 mg / kg) (Figura 21), demonstrando assim que o extrato não induziu toxicidade.

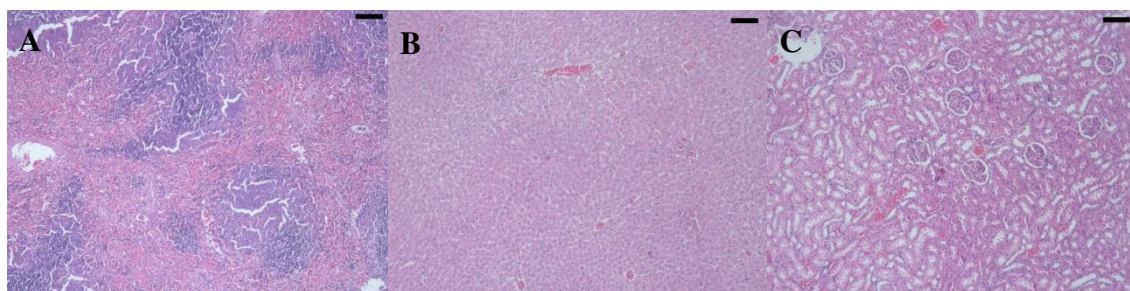


Figura 21: Cortes histológicos exemplares do baço (A), fígado (B) e rim (C). Cortes histológicos exemplares do baço (A), fígado (B) e rim (C). As imagens não mostram sinais de isquemia, necrose, lesão celular e / ou inflamação. (Hematoxilina-Eosina - coloração HE, Bar = 100  $\mu$ m, 100  $\times$ ).

## 17-DISCUSSÃO

Os tratamentos medicamentosos propostos pela literatura apontam os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) estão entre os medicamentos mais comumente prescritos em todo o mundo. Sua capacidade de diminuir a inflamação inibindo a ciclo-oxigenase melhorou a qualidade de vida de muitas pessoas, mas seu uso foi limitado por efeitos colaterais gastrointestinais, como dispepsia, dor abdominal e, em alguns casos, perfuração ou sangramento gástrico ou duodenal (BHUYAN DJ et al., 2019).

O desenvolvimento de inibidores seletivos da COX-2 (coxibs) foi uma resposta à necessidade de medicamentos que inibem a produção de prostaglandinas com maior segurança (BHUYAN DJ et al., 2019). O ácido araquidônico é um mediador inflamatório resultante da ação da fosfolipase A2 nos lipídeos de membrana que posteriormente é metabolizado por enzimas, dentre elas as cicloxigenases, dando origem às prostaglandinas (HOHJOH et al., 2014).

A isoforma constitutiva COX-1 induz a produção de prostaglandinas envolvidas na regulação de funções fisiológicas como a citoproteção da mucosa gástrica, homeostasia renal e função plaquetária. A COX-2 é frequentemente referida como a

isoforma induzível responsável pela produção de prostaglandinas durante a inflamação (SILVA et al., 2017).

No entanto, embora a seletividade desse grupo de compostos possa permitir que a inflamação seja inibida com efeitos mínimos em certos mecanismos homeostáticos, seu papel no metabolismo e reparo ósseo permanece incerto (EINHORN T.A, 2003). Em ensaio de inibição *in vitro*, O EHPA foi capaz de produzir efeito inibitório sobre a isoformas de COX- 2, evidenciando uma inibição maior que 55% a atividade da COX-2 na concentração de 50µg/mL.

A literatura científica descreve o envolvimento de flavonoides inibido mecanismos moleculares de ações anti-inflamatórias, incluindo inibição de enzimas como a COX-2, lipoxigenase, óxido nítrico sintase, NF-κβ, e ativação da proteína 1, de enzimas detoxificantes, da MAPK, proteína quinase C e fator eritróide 2 associado ao fator 2 (YOON et al., 2005),(SANTANGELO et al., 2007). Flavonoides como o canferol, quercetina e morina já foram identificados como inibidores das lipooxigenases (SERAFIM et al., 2010).

Análises químicas usando espectrometria de massa revelaram a presença de (-) - epicatequina e (+) - catequina, confirmada por HPLC-DAD, e outros compostos fenólicos importantes em sementes de abacate, como ácidos cafeoilquínicos, flavonóides, fenilpropanóides e taninos (ATHAYDES et al.,2019) bem como ao trabalho de Tremocoldi que caracterizou a composição química da polpa, casca e sementes de *Persea americana* Mill (TREMECOLDI et al., 2018). Esses resultados obtidos até o momento corroboram aos efeitos analgésicos, anti-inflamatórios do extrato aquoso de *Persea americana* Mill. (ADEYEMI et al.,2002).

Com relação aos marcadores bioquímicos estudos apontam que o consumo de alimentos fontes de ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido oleico, pertencente à série ômega-9, auxilia na redução plasmática das lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol) e colesterol total, apresentando, como consequência, efeitos benéficos à saúde por meio da redução do risco de doenças cardiovasculares (VAFEIADOU et al., 2015), (JORIS et al., 2016). Os estudos com roedores também demonstram que a suplementação dietética com azeite de abacate contribui para a regulação do perfil lipídico e redução dos marcadores bioquímicos de risco cardiovascular, como LDL-colesterol e proteína-C-reativa (ABBOUD et al., 2015). Neste experimento os animais apresentam taxas de glicemia, colesterol total e triglicerídeos normais.

Se tratando dos compostos fenólicos, dados de outra pesquisa comprovam que as procianidinas, catequinas, vanilinas, ácido hidroxifenilacético, entre outros (RUEDA, A et al., 2016) estão associados à prevenção de doenças ocasionadas pela presença de radicais livres, tais como inflamação crônica, hipertensão arterial, diabetes, asma, cardiopatias e doença de Alzheimer (MANACH, C et al., 2004). Em seres humanos, os tocoferóis possuem a capacidade de prevenir danos celulares por inibir a peroxidação lipídica e a formação de radicais livres, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares (CATANIA, A. S et al., 2009).

Em relação às análises radiográficas, percebe-se que a indução foi realizada de maneira correta e com uma padronização da profundidade e formato da fratura. A técnica de fratura utilizada foi adaptada com uso de uma microretífica garantindo uma padronização das fraturas (URABE K et al., 2003), (OGASAWARA A et al., 2008). A formação de uma ponte entre os fragmentos de um osso fraturado constitui o passo mais importante na sua consolidação, a quantidade de calo ósseo é a porção visível nas radiografias (ARO, H et al. 1985).

O raio-x do D21 evidenciamos uma provável formação do calo ósseo sem deformidade do membro no grupo FE. Os animais do grupo fratura não apresentaram sinais consolidação óssea após os 28 dias de experimento, fato evidenciado no experimento e corroborado nas análises radiográficas e histológicas, como também desenvolveram pseudoartrose.

O grupo FN, apresentou uma linha de fratura nítida e pequeno calo, o que sugere que este processo de reparo ósseo ainda não havia sido concluído. No grupo FEN sugere-se que a prática da atividade levou esforço do membro e deformidade óssea, presente na imagem de calo bem delimitada.

Em todos os testes comportamentais, análise da marcha (rotarod) e na distribuição de peso (weight bearing) observou-se uma melhora no decorrer do tempo nos escores de avaliação quando comparados com os grupos que não fizeram uso do EHPA. Ressalta-se que o grupo FE apresentou um comportamento de deambulação normal após 14 dias da indução.

A fratura apresenta duas principais consequências: perda da integridade mecânica e da continuidade do tecido ósseo (MERLOZ P, 2011). Faz-se necessário avaliar a marcha porque a fratura compromete a deambulação do animal. No teste de *Weight Bearing* para avaliação de dor continuada, os resultados mostraram que os grupos tratados com EHPA do D7 ao D28 apresentaram melhora significativa no limiar

da dor e na descarga de peso nos membros, corroborando aos resultados obtidos no teste rotarod.

A cicatrização normal de fraturas é um processo complexo que envolve recrutamento celular, expressão gênica específica e síntese de compostos que regeneram o tecido nativo para restaurar a integridade mecânica e a função do osso danificado (KOMATSU et al., 2010). Existem vários aspectos da cicatrização de fraturas, incluindo fatores biológicos, nutricionais, físicos e genéticos.

No que discorre o processo de fratura a fase inflamatória está associada à formação do hematoma, recrutamento de células tronco mesenquimais, proliferação celular e início da condrogênese. Células progenitoras são recrutadas e chegam ao local da lesão, onde se proliferam e diferenciam-se em condrócitos e osteoblastos. Esse sistema de cascata que é desencadeado após a fratura contribui para o remodelamento das extremidades dos ossos fraturados, garantindo a formação do calo ósseo, que consiste em tecido regenerado de preenchimento do espaço entre dois fragmentos ósseos e recupera a integridade mecânica desfeita pela fratura. A literatura apresenta resultados que corroboram aos efeitos analgésicos e anti-inflamatórios do extrato aquoso de *Persea americana*. (ADEYEMI et al., 2002).

A comparação de consolidação de fraturas experimentais exige similaridade, o que se procurou obter neste experimento. Os animais não foram imobilizados, tendo sido deixados livres para a deambulação, porque a imobilização, além de desnecessária, poderia criar possibilidade de interferência pela presença de material de síntese (GUARNIERO, R et al., 1979). Os resultados histológicos mostraram que os grupos que recebeu extrato apresenta união óssea completa, neste fica mais evidente a aceleração da neoformação. Na quarta semana o grupo FE apresenta formação de tecido ósseo maduro em substituição ao tecido cartilaginoso, onde se apresenta o processo de remodelação óssea completa.

O grupo FEN apresenta união cartilaginosa completa com presença de ponte cartilaginosa unindo as extremidades ósseas, com tecido cartilaginoso retardando a cicatrização. Os demais grupos demonstram pseudoartrose e união cartilaginosa incompleta com presença de restos de tecido fibroso e de placa cartilaginosa que corroborara a incompleta consolidação. O processo de cicatrização evolui para a formação de um calo cartilaginoso, que resulta em uma não união hipertrófica ou uma pseudoartrose (GREEN, E et al., 2005).



Para que a regeneração óssea progrida, o calo mole principal precisa ser reabsorvido e substituído por um calo ósseo. Esta etapa da consolidação da fratura, em certo ponto, lembra o desenvolvimento ósseo embriológico com uma combinação de proliferação e diferenciação celular, com aumento do volume celular e aumento da deposição de matriz (BREUER, B. A. et al, 1991).

Constata-se que na análise do screen toxicológico deste experimento não houve diferença entre o grupo tratado e o grupo S, não ocorrendo alterações no consumo de ração, água e do peso corporal. Demonstrou-se a importância de validar o uso das folhas de *Persea americana* na dose de 750mg/kg em relação à toxicidade em órgãos (rins, fígado e pâncreas) dos ratos, com parâmetro de fase crônica, onde não houve alterações quando comparados os grupos.

Sugere-se dessa maneira que o EHPA possa contribuir como alternativa e/ou complemento terapêutico na consolidação de fratura, acredita-se que na fase de latência do alongamento ósseo e na fase inflamatória do reparo da fratura, as interleucinas são liberadas e agem com fatores de crescimento liberados pelas plaquetas no hematoma local, levando à atração, proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos e outros tecidos mesenquimais diferenciando células à medida que a remodelação assume a forma de osso cortical e esponjoso maduro (HVID I et al., 2016).

## 18. CONCLUSÃO

Sugere-se dessa maneira que o EHPA possa contribuir como alternativa e/ou complemento terapêutico na consolidação de fratura. A eficácia e segurança dos estudos que têm sido desenvolvidos pelo LEED, da Universidade Federal do Maranhão, devem garantir a continuidade da validação necessariamente alicerçada no modelo científico de Pesquisa e Desenvolvimento (P & D) de fármacos, para que no futuro a *Persea americana* Mill. possa ser utilizada como fitoterápico ou fitofármaco; atendendo, assim, a razões sociais e econômicas. Utilizando a potencialidade da flora Maranhense no combate às doenças ósseas. Assim, ofertando opções alternativas e de baixo custo, com terapêutica e sem toxicidade, fortalecendo as políticas públicas de saúde do Estado.

É importante salientar que os animais que utilizaram o EHPA responderam mais rápido o processo de consolidação e não tiveram nenhuma infecção, desta maneira o EHPA poderá diminuir o tempo de hospitalização dos pacientes e os custos para SUS.

## 19-REFERÊNCIAS:

ABBOUD, R. S.; PEREIRA, V. A.; COSTA, C. A. S.; BOAVENTURA, G. T.; CHAGAS, M. A. The action of avocado oil on the lipidogram of wistar rats submitted to prolonged androgenic stimulus. *Nutrición Hospitalaria*, v. 32, n. 2, p. 696-701, 2015. PMID:26268101.

ADEBOYE, J.; FAJONYOMI, M.O; MAKINDE, J.M.; TAIWO, O.B. A preliminary study on the hypotensive activity of *Persea americana* leaf extracts in anaesthetized normotensive rats. *Fitoterapia*, v.70, p.15-20, 1999.

ADEYEMI OO, OKPO SO, OGUNTI OO. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* mill (lauraceae). *Fitoterapia*. 2002;73(5):375-380. doi:10.1016/s0367-326x(02)00118-1

ADEYEMI OO, OKPO SO, OGUNTI OO. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* mill (lauraceae). *Fitoterapia*. 2002;73(5):375-380. doi:10.1016/s0367-326x(02)00118-1

ADIE S, HARRIS IA, NAYLOR JM, RAE H, DAO A, YONG S. Pulsed electromagnetic field stimulation for acute tibial shaft fractures: a multicenter, double-blind, randomized trial. *J Bone Joint Surg Am*. 2011;93: 1569–76.

ANDRIAMANALJAON R, BENATEAU H, BARRE PE, BOUMEDIENE K, LABBE D, COMPERE JF, PUJOL JP. Efeito da Interleucina-1 $\beta$  na transformação do fator de crescimento beta e na expressão da proteína morfogenética óssea-2 no ligamento periodontal humano e alveolar humano. Células ósseas em cultura: modulação por insaponificáveis de abacate e soja. *J. Periodontol*. 2006; 77: 1156-1166. doi: 10.1902 / jop.2006.050356.

ALISA K, HUNG YC, HOU CY, LIM GCW, CIOU JY. Developing New Health Material: The Utilization of Spray Drying Technology on Avocado (*Persea Americana* mill.) Seed Powder. *Foods*. 2020 Jan 30;9(2). pii: E139. doi: 10.3390/foods9020139.

ALONSO, J. Tratado de fitofármacos y nutraceuticos. Rosário, Argentina. Editora Corpus. p.69-72, 2004.

APOLINÁRIO JC, COELHO WMD & LOUZADA MJQL. (2011). Análise da influência do ultrassom de baixa intensidade na região de reparo ósseo em ratos sob ausência de carga. *Fisioterapia e Pesquisa*, 18(3), 275-279. doi: 10.1590/S1809-29502011000300013.

ARAUJO FRD C. Ponto final humanitário na experimentação animal: um estudo da aplicação na área de vacinas. Rio de Janeiro, 2015. 129f. Tese (Clínica e Reprodução Animal). Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, 2015.

ARGIN E, ERDEN Z. The effect of group exercise on postmenopausal osteoporosis and osteopenia. TRNC, Mehmet Reis Physical Therapy and Rehabilitation Center; Hacettepe University, Faculty of Health Sciences, Department of Physical Therapy and Rehabilitation, Acta Orthop Traumatol Turc. Vol. 43. Num. 4. 2009. p. 343-350.

ANTIA, B.S; OKOKON, J. E.; OKON, P. A. Hypoglycemic activity of aqueous leaf extract of *Persea americana* Mill. Indian Journal of Pharmacology. v.37, n.5, p.325-326, 2005.

ARO, H. EEROLA, E., AHO, A. J: Determination of callus quantity in 4-week-old fractures of the rat tibia. J. Orthop. Res. 3: 101-108. 1985.

ARRUDA LRP, SILVA MAC, MALERBA FG, TURÍBIO FM, FERNANDES MC, MATSUMOTO MH. Fraturas expostas: estudo epidemiológico e prospectivo. Acta Ortop Bras. 2009; 17(6):326-30.

ATHAYDES BR, ALVES GM, ASSIS ALEM, GOMES JVD, RDRIGUES RP, CAMPAGNAO BP, NOGUEIRA BV, SILVEIRA D, KUSTER RM, PEREIRA TMC, KITAGAWA RR, GONÇALVES RCR. Avocado seeds (*Persea americana* Mill.) prevents indomethacin-induced gastric ulcer in mice. Food Res Int. 2019; 119:751-760. doi:10.1016/j.foodres.2018.10.057.

AZAD, V, BREITBART E, AL-ZUBE L, YEH S, O'CONNOR JP, LIN SS. rhBMP-2 enhances the bone healing response in a diabetic rat segmental defect model. J Orthop Trauma, v. 23, n. 4, p. 267-76, Apr 2009. ISSN 1531-2291 (Electronic) 0890-5339 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19318870> >.

BAHAR I. Intrinsic dynamics of enzymes in the unbound state and relation to allosteric regulation. Curr. Opin. Struct Biol, 17, 633-640, 2007.

BARBOSA JS, AGUIAR CB, SOUZA ENA 2010. A Fitomedicina da Feira de Campina Grande PB. RBC 1: 1-1.

BERGH, B.; ELLSTRAND, N. California Avocado Society. Yearbook 70: 135-146, 1986.

BHATTACHARYYA SS, PAUL S, DUTTA S, BOUJEDAINI N, KHUDA BAR. Potenciais anti-oncogênicos de uma cumarina vegetal (7-hidroxi-6-metoxi cumarina)

contra 7,12-dimetilbenz [a] antraceno- papiloma cutâneo induzido em camundongos: O possível papel de várias proteínas-sinal principais. *Queixo. J. Integr. Med.* 2010; 8: 645-654. doi: 10.3736 / jcim20100708.

BHUYANDJ, VUONG QV, CHALMERS AC, VAN AIA, BOWYER MC, SCARLETT CJ. Investigação de fitoquímicos e capacidade antioxidante de espécies selecionadas de eucalipto usando extração convencional. *Chem. Pap.* 2016; 70: 567-575. doi: 10.1515 / chempap-2015-0237.

BOHARI B, DEWI NU, RAHMAN N. Phytochemical and Antioxidant Activity of Avocado Leaf Extract (*Persea americana* Mill.). *Asian Journal Scientific Research.* 2018.

BONFIM BF. Ação de *Persea americana* Mill. em modelo experimental de osteoartrite em ratos. 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

BOYADZHIEVA S, GEORGIEVA S, ANGELOV G. Otimização da extração de antioxidantes naturais de sementes de abacate. *Bulg. Chem. Comum.* 2018; 50: 80-84.

BRASIL. Ministério da Saúde. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 156 p. n. 31. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Manual de implantação de serviços de práticas integrativas e complementares no SUS / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde Plantas de Interesse ao SUS. Portal da saúde [online]. 2014. Disponível em <<http://portalsaude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/466-ctie-raiz/daf-raiz/ceaf-ctie/fitoterapicos-cgafb/12>>.

BREUER, B. A.; VANENKEVORT, B. A.; FARNUM, C. E.; Linear relationship between the volume of hypertrophic chondrocytes and the rate of longitudinal bone growth plates. *Journal of Orthopaedic Research*, New York, v.9, n.3, p.348-359, 1991.

CANTO, W.L; SANTOS, L.C; TRAVAGLINI, M.M.E. Óleo de abacate: extração, usos e seus mercados atuais no Brasil e na Europa. *Estudos Econômicos*, Campinas: ITAL, 1980.144P.( Alimentos Processados,11).

CARVAJAL ZO, NOLASCO HC, AGUILAR UMG, MELO SG, HAYWARD JPM, BARRADAS DDM. A suplementação de óleo de abacate modifica marcadores de perfil

de risco cardiovascular em um modelo de rato induzido por sacarose. Alterações metabólicas. Dis. Marcadores. 2014; 2014 : 386425. doi: 10.1155 / 2014/386425.

CASTRO, TL. Estudo do Mecanismo de Ação Antinociceptivo da *Persea americana* Mill. 2020. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

CATANIA, A. S.; BARROS, C. R.; FERREIRA, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, v. 53, n. 5, p. 550-559, 2009.

CHBIKWA TG, BARBIER FF, TANURDZIC M, BEVERIDGE CA. Transcriptome assembly and annotation for gene discovery in avocado, macadamia and mango. Sci Data. 2020 Jan 8;7(1):9. doi: 10.1038/s41597-019-0350-9.

CLAES L, RECKNAGEL S, IGNATIUS A. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. Nat Rev Rheumatol. 2012;8(3):133-43.

COURT BCM, BUGLER KE, CLEMENT ND, DUCKWORKH AD, MCQUEEN MM. The epidemiology of open fractures in adults. A 15-year review. Injury. 2012; 43(6):891-7.

CUNHA FVM, FILHO OFIM, MOURA FS, MARTINS MCC. Effects of exercise and testosterone administration on tibia fracture healing in rats' Fisioterapia em Movimento Print version ISSN 0103-5150 On-line version ISSN 1980-5918 Fisioter. mov. vol.25 no.4 Curitiba Oct./Dec. 2012

DANIA KM. Avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos das sementes de *Persea americana* Mill. Lauraceae. Universidade Federal do Paraná, Curitiba 2013.

DEEPTI D, SHEGOG MR, GREGORY RZ, LAMBERT DJ. Current Pharmaceutical Design, Volume 19, Number 34. Bentham Science Publishers. Avocado (*Persea americana*) Seed as a Source of Bioactive Phytochemicals. 2013.

DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA-dbca. Disponível em: . Acesso em 5 de fevereiro de 2016.

EINHORN TA. Cox-2: Where are we in 2003? - The role of cyclooxygenase-2 in bone repair. *Arthritis Res Ther*. 2003;5(1):5-7. doi:10.1186/ar607

ENGEL N, OPPERMANN C, FALODUM A, Kragl U. Efeitos proliferativos de cinco extratos tradicionais de plantas medicinais nigerianas nas linhas celulares de câncer de mama e osso humano. J. Ethnopharmacol. 2011; 137: 1003-1010. doi: 10.1016 / j.jep.2011.07.023.

Farmacopéia Brasileira, Agência nacional de Vigilância Sanitária, 5ª Edição, V. 2, Brasília, 2010.

FAZZALARI NL. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int*, v. 22, n. 6, p. 2003-6, Jun 2011. ISSN 1433-2965 (Electronic).

FERREIRA ICRF, MELGAR B, DIAS MI, CIRIC A, SOKOVIC M, GARCIA CEM RODRIGUEZ LAD, BARROS L. Bioactive characterization of *Persea americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants. *Industrial Crops & Products*. v. 111, p.212-218,2018.

FERNANDES HJA, REIS FB. Fraturas da diáfise de fêmur. In Franco SF, Lourenço PRB. *Traumatologia ortopédica*. Rio de Janeiro. Revinter; 2004. P 19-30. Campbell WC, editor. *Cirurgia ortopédica de Campbell*, 8ª.ed. São Paulo: Manole; 1996. Rockwood CA Jr, Green DP, Bucholz RW, editors. *Fraturas em adultos*. 3ª.Ed, São Paulo: Manole; 1993,.p. 179-91.

FIGUEROA JG, BORRÁS-LINARES I, LOZANO SJ., SEGURA CA. Identificação abrangente de compostos bioativos da casca de abacate por cromatografia líquida acoplada a Q-TOF de massa precisa de altíssima definição. *Food Chem*. 2018; 245: 707–716. doi: 10.1016 / j.foodchem.2017.12.011.

FILANNINO P, TLAIS AZA, MOROZOVA K, CAVOSKI I, SCAMPICCHIO M, Gobbetti M, DI CAGNO R. Lactic acid fermentation enriches the profile of biogenic fatty acid derivatives of avocado fruit (*Persea americana* Mill.). *Food Chem*. 2020 Jul 1;317:126384. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126384. Epub 2020 Feb 10.

FRANÇA LG, Avaliação Pré-clínica de *Persea americana* Miller: caracterização química, toxicidade e potencial farmacológico na modulação da dor neuropática em ratos. 2018. Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

FRAJACOMO FT, FALCAI MJ, FERNANDES CR, SHIMANO AC, GARCIA SB. Biomechanical adaptations of mice cortical bone submitted to three different exercise modalities. *Acta Ortop Bras*. 2013; 21(6):328-32.

GAERTNER, DJ, HALLMAN TM , HANKENSON FC, batchelder MA. 2008. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 2th Edition, Academic Press, CA.

GOBATTO FBM, GOBATTO CA, RIBEIRO C, MOTA CSAM, ARAUJO GG, ARAUJO MB, MELLO MAR. Limiar anaeróbico em corrida e natação para ratos: determinação utilizando dois métodos matemáticos, R.da Educação Física/UEM, Maringá.v.21.n.2,p.245-253,2 trim.2010.

GUARNIERO, R., BARROS, T.E.P.,ZERBINI, CA.F., RODRIGUES C.J.J., PEDRIELLI CORSATO, M., REIS, P.R.: Estudo da consolidação de fraturas na

desnutrição protéica: trabalho experimental com o uso da calcitonina em ratos desnutridos. São Paulo, 1979.45p.(Monografia). Departamento de Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

GUIMARÃES APFGM. Decanoato de nandrolona, qualidade óssea e calo ósseo em fratura do fêmur de rato. Ribeirão Preto 2017, Universidade de São Paulo.

GUMBEL D, MATTHES G, NAPP M, LANGE J, HINZ P, SPITZMULLER R. Current management of open fractures: results from an online survey. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2016; 136(12):1663-72.

GREEN, E.; LUBAHN, J. D.; EVANS, J. Risks factors treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. *Journal of Surgical Orthopaedic Advances*, Towson, v.14, n.2, p.64- 72, 2005.

HARRI M, KUUSELA P. Is swimming exercise or cold expose for rats? *Acta Physiological Scandinavia*, Stockholm, v. 126, p. 189-197, 1986.

HASENCLEVER, L; PARANHOS J, COSTA CR, CUNHA G, VIEIRA D. The Brazilian phytotherapics industry: challenges and opportunities. *Ciênc. Saúde coletiva* [online]. 2017, vol.22, n.8, pp.2559-2569. ISSN 1413-8123.

HOHJOH, H.; INAZUMI, T.; TSUCHIYA, S.; SUGIMOTO, Y. Receptores prostanóides e inflamação aguda na pele. *Biochimie.* 2014, 107, 78-81

HONDA A, SOGO N, NAGASAWA S, SHIMIZU T, UMEMURA Y. High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v. 95, n. 3, p. 1.032-1.037, 2003.

HUANG TH, LIN SC, CHANG FL, HSIEH SS, YANG RS. Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male Wistar rats. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, Baltimore, v. 26, n. 4, p. 350-357, 2008.

HUANG TH, LIN SC, CHANG FL, HSIEH SS, LIU SH, YANG RS. Effects of different exercise modes on mineralization, structure, and biomechanical properties of growing bone. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v. 95, n. 1, p. 300-7, 2003.

HUANG TH, HSIEHSS, LIU SH, CHANG FL, LIN SC, YANG RS. Swimming training increases the post-yield energy of bone in young male rats. *Calcified Tissue International*, Berlin, v. 86, n. 2, p. 142-53, 2010.

HVID I, HORN J, HUHNSOCK S, STEEN H. The biology of bone lengthening. *J Child Orthop*. 2016;10(6):487-492. doi:10.1007/s11832-016-0780-2

JAGODZINSKI M, KRETTEK C, Effect of mechanical stability on fracture healing-an update. *Injury*.2007;38 Suppl 1:S3-10.doi:10.1016?j.injury.2007.02.005.

JOÃO JWS. Reflexões sobre o uso racional de medicamentos. *Pharmacia Brasileira*, v.78, p.15-16,2010.

JORIS, P. J.; MENSINK, R. P. Role of cis-monounsaturated fatty acids in the prevention of coronary heart disease. *Current Atherosclerosis Reports*, v. 18, n. 7, p. 38-45, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s11883-016-0597-y>. PMID:27221500.

JUNIOR STV, JUNIOR APA, SOMBRA LP, JUVÊNCIO OAC, ALVES FRV. Epidemiology of tibial diaphyseal fractures in a reference municipal hospital in traumatology. *Rev. Med UFC*. 2017; 57(3): 12-17.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: KOOGAN, G. (Ed.). *Histologia Básica*. Rio de Janeiro, v.12, 2017. cap. 8, p.132-148.

KALFF, K. M; EL MOUEDDEN, M; EGMOND, J. Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. *European Journal of Pharmacology*., n. 641, p. 108-113, 2010.

KAWCAK CE, FRISBIE DD, MCLLWRAITHCLL CW, WERPY NM, PARK RD. Avaliação de extratos insaponificáveis de abacate e soja para tratamento de cavalos com osteoartrite induzida experimentalmente. *Sou. J. Vet. Res*. 2007; 68: 598–604. doi: 10.2460 / ajvr.68.6.598.

KAYAL, R. A. et al. Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment. *Bone*, v. 44, n. 2, p. 357-63, Feb 2009. ISSN 1873-2763 (Electronic) 1873-2763 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19010456> >.

KOGA T, NIIKURA T, LEE SY, OKUMACHI E, UEHA T, IWAKURA T. Tropical cutaneous CO2 application by means of a novel hydrogel accelerates fracture repair in rats. *J Bone Joint Surg Am*. 2014; 96: 2077-84 (25).

KOLLER, O.C ABACATICULTURA. Porto Alegre,1984.

KOMATSU DE, WARDEN SJ: The control of fracture healing and its therapeutic targeting: Improving upon nature. *J Cell Biochem*. 109:302–311. 2010.PubMed/NCBI.



KRISHNAKUMAR GS, ROFFI A, REALE D, KON E, FILARDO G. Clinical application of bone morphogenetic proteins for bone healing: a systematic review. *Int Orthop*. 2017;41:1073–83.

LIU, PEI-YANG, KENNETH BS, JASMINKA ZI. Aerobic Exercise and Whole-Body Vibration in Offsetting Bone Loss in Older Adults. *SAGE-Hindawi Access to Research Journal of Aging Research* Volume 2011, Article ID 379674, 9 pages doi: 10.4061/2011/379674.

LIMA NFM. Mecanismo de ação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da *Persea americana*. 2018. 72f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

LIMA RAO, FREIRE APCF, GUMIARÃES A, SANTOS CP, PACAGNELI FL. Efetividade da corrente russa no processo de regeneração óssea em ratos. Universidade do Oeste Paulista (UNOES, Fisioterapia em Movimento, 2017.

LIPPIELLO L, NARDO JV, HARLAN R, CHIOU T. Efeitos metabólicos de abacate / soja insaponificáveis em condrócitos articulares. *Evid. Complemento Baseado. Alternat. Med*. 2008; 5: 191–197. doi: 10.1093 / ecam / nem132.

LÓPEZ-COBO A, GÓMEZ CAM, PASINI F, CABONI MF, SEGURA CA, FERNANDÉZ GA. HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS e HPLC-FLD-MS como ferramentas valiosas para a determinação de compostos fenólicos e outros compostos polares na parte comestível e subprodutos do abacate. *Lwt Food Sci. Technol*. 2016; 73: 505-513. doi: 10.1016 / j.lwt.2016.06.049.

LU QY, ARTEAGA JR, ZHANG Q, HUERTA S, GO VL, HEBER D. Inibição do crescimento de células de câncer de próstata por um extrato de abacate: Papel de substâncias bioativas solúveis em lipídios. *J. Nutr. Biochem*. 2005; 16 : 23-30. doi: 10.1016 / j.jnutbio.2004.08.003.

MAHEU E, CADET C, MARTY M, MOYSE D, KERLOCH I, COSTE P, DOUGADOS M, MAZIERES B, SPECTOR TD, HALLOLH. Estudo randomizado e controlado do efeito insaponificável de abacate-soja (Piascledine) na modificação da estrutura na osteoartrite do quadril: o estudo ERADIAS. *Ann. Rheum. Dis*. 2014; 73 : 376-384. doi: 10.1136 / annrheumdis-2012-202485.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* , v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004. <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>. PMID:15113710.

MARANGON L, GOBATTO CA, MELLO MAR, KOKUBUN E. Utilization of an hyperbolic model for the determination of the critical load in swimming rats. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, St. Louis, v. 34, p. 149, 2002. Supplement.

MAYSA DSC. Consolidação óssea após fratura do fêmur em ratas diabéticas tratadas com terapia por vibração. Ribeirão Preto 2016. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

MERLOZ P. Macroscopic and microscopic process of long bone fracture healing. *Osteoporos Int*, v.22, n.6, p.1999-2001, Jun 2011. ISSN 1433-2965 (Electronic) 0937-941X (Linking).

NAVEED M, HEJAZI V, ABBAS M, KAMBOH AA, KHAN GJ, SHUMZAID M, AHMAD F, BABAZADEH D, FANGFANG X, MODARRESI GF. Ácido clorogênico (CGA): Uma revisão farmacológica e solicita mais pesquisas. *Biomed. Pharmacother.* 2018; 97: 67-74. doi: 10.1016 / j.biopha.2017.10.064.

NIKURAL T, IWAKURA A, TAKASHI O, LEE SY, KAKAI Y, AKISUE T, KEISUKE O, FUKUI T, MATSUSHITA T, MATSUMOTO T, KURODA R. Topical cutaneous application of carbon dioxide via a hydrogel for improved fracture repair: results of phase I clinical safety trial. Niikura et al. *BMC Musculoskeletal Disorders* (2019) 20:563.

OBOH G, ISAAC AT, AKINYEMI AJ, AJANI RA. Inibição de enzimas chave ligadas ao diabetes tipo 2 e à peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio no pâncreas de ratos por extratos fenólicos de folhas e frutos de pera de abacate. *Int. J. Biomed. Sci.* 2014; 10: 208-216.

OCARINO NM, SERAKIDES R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. Vol 12. Num. 3. Novembro 2005. p.164-168.

OGASAWARA A, NAKAJIMA A, NAKAJIMA F, GOTO K, YAMAZAKI M. Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Bone*, v. 43, n. 5, p. 832-9, Nov 2008. ISSN 8756-3282 (Print) 1873-2763 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18725334>

OGASAWARA A, NAKAJIMA A, NAKAJIMA F, GOTO K, YAMAZAKI M. Molecular basis for affected cartilage formation and bone union in fracture healing of the streptozotocin-induced diabetic rat. *Bone*. 2008;43(5):832-839. doi:10.1016/j.bone.2008.07.246

OLIPHANT CM, GREEN GM. Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician*. 2002;65:455-64. Tuncay I, Ozbek H, Kosem M, Unal O. A comparison of effects of fluoroquinolones on fracture healing (an experimental study in rats). *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2005;11:17-22

OLIVEIRA AP, FRANCO EDS, RODRIGUES BR, CORDEIRO DP, MELO RG, AQUINO CMF, e SILVA AAR, MEDEIROS PL. Efeito da Formulação Semissólida do Óleo de Persea Americana Mill (Abacate) na Cicatrização de Feridas em Ratos. Evid. Complemento Baseado. Alternat. Med. 2013; 2013: 8. doi: 10.1155 / 2013/472382.

OLIVEIRA P, SPERANDIO E, FERNANDES KR, PASTOR FAC Pastor, NONAKA K O, RENNO ACM. Comparação dos efeitos da laserterapia de baixa intensidade e do ultra-som pulsado de baixa intensidade no processo de reparo ósseo na tibia de rato Revista Brasileira de Fisioterapia, *Versão impressa* ISSN 1413-3555 Rev. bras. fisioter. vol.15 no.3 São Carlos maio / junho de 2011.

ORTEGA AHF, JIMENEZ DRM, VELEZ PC. Efeitos neuroprotetores do extrato metanólico de abacate Persea americana (var. Colinred) casca na deficiência locomotora induzida por paraquat, peroxidação lipídica e falta de vida em knockdown transgênico parkin drosophila melanogaster. Neurochem. Res. 2019; 44 : 1986-1998. doi: 10.1007 / s11064-019-02835-z.

ORYAN A, MONAZZAH S, BIGHAM-SADEGH A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Environ Sci.* 2015;28(1):57-71. doi:10.3967/bes2015.006.

BHUYAN DJ.; ALSHERBINY MA.; PERERA S, LOW M, BASU A, DEVI OA BAOOAH MS, LI, CG PAPOUTSIS K. The Odyssey of Bioactive Compounds in Avocado (*Persea americana*) and Their Health Benefits. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(10):426. doi:10.3390/antiox8100426.

OWOLABI, M.A.; JAJA, S.I.; COKER, H.A.B. Vasorelaxant action of aqueous extract of the leaves of *Persea americana* on isolated thoracic rat aorta. *Fitoterapia*, v.76, p.567-573, 2005.

PAMPLONA GD, ROGER MD 1999. Encyclopaedia of Medicinal Plants, pp.719-720. Pavela R 2008. Larvicidal effects of various Euro-Asiatic plants against *Culex quinquefasciatus* Say larvae (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res* 102:55-559.

PARK S, SILVA M. Neuromuscular electrical stimulation enhances fractures healing: results of an animal model. *J Orthopaed Res.* 2004;22:38287.doi:10.1016/j.orthres.2003.08.007.

PATRICK S, E VILLANO, J. The Laboratory Rat. 2ed, CRC:Boca Raton, Flórida, 2013.

PIAO, G; YUAN, H; MA, Q; YE, L. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules.* v.21, p. 559, 2016.

PRENTICE WE. Fisioterapia na prática esportiva uma abordagem baseada em competências. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

RAMOS JMDR, VILLANUEVA S, JERZ G, WINTERHALTER P, DETERS AM. *Persea americana* Mill. Semente: Fracionamento, Caracterização e Efeitos em

Queratinócitos e Fibroblastos Humanos. Evid. Complemento Baseado. Altern. Med. 2013; 2013: 391247. doi: 10.1155 / 2013/391247.

RAYMOND CTW, Atividade antimicrobiana de Dykes GA do extrato bruto de epicarpo e sementes de abacate maduro (*Persea americana*) de três cultivares. Pharm. Biol. 2010; 48: 753-756. doi: 10.3109 / 13880200903273922

REGO TJA Fitogeografia das Plantas Medicinais no Maranhão. 2a. edição Editora UFMA, São Luís, Brasil, 150p, 1995.

ROCHA JCT. TERAPIA LASER, Cicatrização tecidual e angiogênese. RBPS 2004; 17(1): 44-8.

RODRIGUES FL, ABRE LC, VALENTI VE, VALENTE AL, DA COSTA PCR, POHL PH. Bone tissue repair in patients with open diaphyseal tibial fracture treated with biplanar external fixation or reamed locked intramedullary nailing. Injury. 2014; 45(Supl 5):S32-5.

RUEDA, A.; SAMANIEGO-SÁNCHEZ, C.; OLALLA, M.; GIMÉNEZ, R.; CABRERA-VIQUE, C.; SEIQUER, I.; LARA, L. Combination of analytical and chemometric methods as a useful tool for the characterization of extra virgin argan oil and other edible virgin oils. role of polyphenols and tocopherols. Journal of AOAC International, v. 99, n. 2, p. 489-494, 2016. <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.15-0121>. PMID:26953066.

SALEHI B, RESCIGNO A, DETTORI T, CALINA D, DOCEA AO, SINGH L, CEBECI F, OZÇELIK B, BHIA M, BEIRAMI AD, RAD JS, SHAROPOV F, CHO WC, MARTINS Natalia. Avocado-Soybean Unsaponifiables: A PANOPLY OF Potentialities to Be Explored. *Biomolecules* 2020, 10(1), 130; <https://doi.org/10.3390/biom10010130>. This article belongs to the Special Issue Pharmacology of Medicinal Plants).

SANTANA I, CASTELO BVN, GUIMARÃES BM, SILVA LDO, PEIXOTO VODS, CABRAL LMC, FREITAS SP, TORRES AG. Óleo de abacate Hass (*Persea americana* Mill.) Enriquecido em compostos fenólicos e tocoferóis pressionando por expeller o microondas não descascado fruta seca. Food Chem. 2019; 286 : 354–361. doi: 10.1016 / j.foodchem.2019.02.014.

SANTANGELO, C; VARI, R; SCAZZOCHIO, B; DI BENEDETTO, R; FILES, C. MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*. v. 43, n.4, p.394-405, 2007.

SCHOTT E, BERGE OG, ANGEY-MOLLER K, HAMMARSTROM G, DALSGAARD CJ, BRODIN E. Weight bearing as an objective measure of arthritic pain in the rat. J Pharmacol Toxicol Meth 1994, 31:79-83.

SEGOVIA FJ, CORRAL-PÉREZ JJ, ALMAJANO MP. Sementes de abacate: Modelagem de extração de compostos bioativos. *Ind. Crop. Prod.* 2016; 85: 213-220. doi: 10.1016 / j.indcrop.2016.03.005.

SERAFINI, M; PELUSO, I; RAGUZZINI, A. Antioxidants and the immune system: Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proceedings of the Nutrition Society.* v. 69, p. 273-278, 2010.

SHIGA K, HARA H, OKANO G, MANABU I, AKIO M, FUSAO M, FUSAO T. Ingestion of difructose anhydride III and voluntary running exercise independently increase femoral and tibial bone mineral density and bone strength with increasing calcium absorption in rats. *The Journal of Nutrition, Bethesda,* v. 133, n. 12, p. 4.207-4.211, 2003.

SILVA, RHM; LIMA, NDFM; LOPES, AJO; VASCONCELOS, CC; DE MESQUITA, JWC; DE MESQUITA, LSS; LIMA, FCVM; RIBEIRO, MNDS; RAMOS, RM; CARTÁGENES, MDSDS; Atividade antinociceptiva de *Borreria verticillata*: Estudos in vivo e in silico. *Frente. Pharmacol.* 2017 , 8 , 1-14.

TOURNIS S, MICHPOULOU E, FATOUROS IG, MICHALOPOULOU E, FATOUROS IG, PASPATI MIM, RAPTOU DL, AVLONITI A, KREKOUKIA M, ZOUVELOU V, GALANOS A, AGGELOUSIS N, KAMBASL AD, LYRITIS GP, TAXILDARIS K, PAPPAIOANNOU N. Effect of rhythmic gymnastics on volumetric bone mineral density and bone geometry in premenarcheal female athletes and controls. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, Chevy Chase,* v. 95, n. 6, p. 1-8, 2010.

TREMOCOLDI MA, ROSALEN PL, FRANCHIN M, MASSARIOLI AP, DENNY C, DAIUTO ÉR, PASCHOAL JAR, Melo PS, ALENCAR SMD. Exploração de subprodutos de abacate como fontes naturais de compostos bioativos. *PLoS ONE.* 2018; 13 : e0192577. doi: 10.1371 / journal.pone.0192577.

UDUPA KN, PRASAD GC. Chemical and histochemical studies of organic constituents in fracture repair in rats. *J Bone Joint Surg Br.* 1963, 45: 770-9.

URABE K, KIM HJ, SARKAR G, BRONK JT, BOLANDER ME. Determination of the complete cDNA sequence of rat type II collagen and evaluation of distinct expression patterns of types IIA and IIB procollagen mRNAs during fracture repair in rats. *J Orthop Sci,* v. 8, n. 4, p. 585-90, 2003. ISSN 0949-2658 (Print) 0949-2658 (Linking). Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12898314](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12898314)>.

URABE K, KIM HJ, SARKAR G, BRONK JT, BOLANDER ME. Determination of the complete cDNA sequence of rat type II collagen and evaluation of distinct expression patterns of types IIA and IIB procollagen mRNAs during fracture repair in rats. *J Orthop Sci.* 2003;8(4):585-590. doi:10.1007/s00776-003-0658-2

VAFEIADOU, K.; WEECH, M.; ALTOWAIJRI, H.; TODD, S.; YAQOOB, P.; JACKSON, K. G.; LOVEGROVE, J. A. Replacement of saturated with unsaturated fats had no impact on vascular function but beneficial effects on lipid biomarkers, E-selectin, and blood pressure: results from the randomized, controlled dietary intervention and vascular function (DIVAS) study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 102, n. 1, p. 40-48, 2015. <http://dx.doi.org/10.3945/ajcn.114.097089>. PMID:26016869.

VAINIONPÄÄ A, KORPELAINEN R, SIEVÄNEN H, VIHRIÄLÄ E, LEPPÄLUOTO J, JÄMSÄ T. Effect of impact exercise and its intensity on bone geometry at weight-bearing tibia and femur. *Bone, Boston*; v. 40, n. 3, p. 604–611, 2007.

VENDITTI P, DI Meo S. Antioxidantes, danos nos tecidos e resistência em ratos jovens treinados e não treinados. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 331 (1): 63–68.

WELCH JM, TURNER CH, DEVAREDDY D, ARJMANDI BH, WEAVER CM. High impact exercise is more beneficial than dietary calcium for building bone strength in the growing rat skeleton. *Bone, Boston*, 2008; v. 42, n. 4, p. 660–668, 2008.

WAMOTO J, YEH JK, ALOIA JF. Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat. *Bone, Bethesda*, v. 24, n. 3, p. 163-9, 1999.

WANG W, BOSTIC TR, GU L. Capacidades antioxidantes, procianidinas e pigmentos em abacates de diferentes cepas e cultivares. *Food Chem.* 2010; 122: 1193-1198. doi: 10.1016 / j.foodchem.2010.03.114.

WANG M, ZHENG Y, KHUONG T, LOVATT CJ. Efeito da data da colheita na qualidade nutricional e capacidade antioxidante no abacate 'Hass' durante o armazenamento. *Food Chem.* 2012; 135: 694–698. doi: 10.1016 / j.foodchem.2012.05.022

YOON, J.H; BAEK, S.J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Medical Journal* v.46, n.5, p.585-596, 2005.

## ANEXO



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA**

**CIAEP: 01.0341.2014**



Comissão de Ética no Uso de Animais

**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DA AÇÃO PERSEA AMERICANA MILL. NA CONSOLIDAÇÃO DE FRATURA ÓSSEA EM RATOS ", Processo nº 23115.035401/2018-26, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartagenes**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - 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 considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

**Comissão de Ética no Uso de Animais**

| FINALIDADE              | ( ) ENSINO (X) PESQUISA ( ) EXTENSÃO      |
|-------------------------|-------------------------------------------|
| Vigência da autorização | 01/03/2019 a 30/12/2020                   |
| Espécie/linhagem/raça   | Ratos – <i>Rattus norvegicus</i> (Wistar) |
| Nº de animais           | 80 animais                                |
| Peso/Idade              | 250 a 300g                                |
| Sexo                    | Machos                                    |
| Origem                  | Biotério Central da UFMA                  |

*Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho*  
 Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA