



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU

MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA E ANTIMICROBIANA
DO ÓLEO ESSENCIAL DA *CURCUMA LONGA***

RAFAEL GONÇALVES MACHADO DE ARAÚJO

GOIÂNIA-GOIÁS

2013



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU

MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DA *CURCUMA LONGA*

MESTRANDO: RAFAEL GONÇALVES MACHADO DE ARAÚJO

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis
Co-orientador: Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pós Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

GOIANIA-GO

2013

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

Araújo, Rafael Gonçalves Machado.

A663a Avaliação das atividades angiogênica e antimicrobiana do óleo essencial da *Curcuma longa* [manuscrito] / Rafael Gonçalves Machado de Araújo. – 2013.
44 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, 2013.
“Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis”.

1. Neovascularização. 2. Agentes antiinfeciosos. 3. Cúrcuma. I. Título.

CDU: 615.2:582.572.7(043)



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 22 DE MARÇO DE 2013 E CONSIDERADO
APROVADO PELA BANCA EXAMINADORA:

1)

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis / PUC Goiás (Presidente)

2)

Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Júnior / PUC Goiás (Membro)

3)

Profa. Dra. Fátima Mrué / UFG (Membro Externo)

4)

Profa. Dra. Karlla Greick Batista Dias Penna / PUC Goiás (Membro)

5)

Profa. Dra. Maira Barberi / PUC Goiás (Suplente)

“Assim como um organismo vivo responde a influências ambientais com mudanças estruturais, essas mudanças, por sua vez, alterarão seu comportamento futuro. Em outras palavras, um sistema estruturalmente acoplado é um sistema de aprendizagem.”

Fritjof Capra

“Filho meu, atenta para as minhas palavras; às
minhas razões inclina o teu ouvido.

Não as deixes apartar-se dos teus olhos; guarda-as
no íntimo do teu coração.

Porque são vida para os que as acham, e saúde para
todo o seu corpo.”

Provérbios 4:20-22

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais: Luiz Antônio e Maria Aparecida; à minha irmã Raquel Gonçalves; à minha esposa Janne Eire. Amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me aberto os olhos e por ter me dado forças para realizar os meus trabalhos e outros que estão por vir...

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis por todo o seu apoio.

Ao co-orientador Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva.

Aos meus pais.

À minha esposa Janne Eire

Ao Cláudio Braz da Silva, ao Eduardo de Paiva, à Larissa Magalhães, ao Daniel Paiva e à Cláudia Rachid por terem me auxiliado durante os experimentos e pelos valiosos conselhos.

A Naturae LTDA pelo apoio financeiro que foi vital para minha permanência no Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde

Aos meus colegas de trabalho na Vitalitá - Farmácia de Manipulação, especialmente ao Rogério Guimarães Toledo e Adrianna Simon de Oliveira.

A PUCGo, por todo o aparato técnico necessário às pesquisas.

Ao Jader Alves Gomes, secretário do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

RESUMO

Neste trabalho foram avaliadas as atividades angiogênica e antimicrobiana do óleo essencial da *Curcuma longa* (açafraão). O óleo essencial foi extraído pelo método da hidrodestilação por arraste a vapor, a partir do pó dos rizomas do açafraão. A atividade angiogênica foi avaliada pelo método experimental da membrana corioalantóide, e o tratamento estatístico realizou-se por meio da análise de variância (Kruskal-Wallis) e por comparação múltipla (método de Dunn) do grupo teste com os grupos dos controles, considerando o nível de significância de $p < 0,05$. A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi avaliada para bactérias gram negativa *Escherichia coli* e gram positiva *Staphylococcus simulans*. No teste realizado com a membrana corioalantóide, o óleo essencial do açafraão produziu aumento da rede vascular superior ao controle negativo e inibidor ($p < 0,05$), não apresentou diferença estatística quanto comparada ao controle indutor ($p > 0,05$). A avaliação da atividade antimicrobiana demonstrou que não houve formação do halo de inibição para o óleo essencial do açafraão.

Palavras chave: Fitoterapia, angiogênese, *Curcuma longa*, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

In this study, the angiogenic and antimicrobial activities were evaluated for essential oil of *Curcuma longa* (turmeric). The essential oil was extracted by hydrodistillation by steam distillation method from the powder of the rhizomes of turmeric. The angiogenic activity was evaluated by experimental chorioallantoic membrane, and statistical treatment was performed by analysis of variance (Kruskal-Wallis) and multiple comparison (Dunn's method) of the test group and control groups, considering significance of $p < 0.05$. The antimicrobial activity of essential oil was evaluated for gram negative *Escherichia coli* and gram positive *Staphylococcus simulans*. In the test conducted with the chorioallantoic membrane, the essential oil from turmeric produced increased vascular network over the negative control and inhibitor ($p < 0.05$), approaching the control inductor ($p > 0.05$). The antimicrobial activity showed that there was no inhibition zone for the essential oil of turmeric.

Key words: Phytotherapy, angiogenesis, wound healing, *Curcuma longa*, antimicrobial activities

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TERÓRICO	18
2.1 Potencial farmacológico do açafrão	23
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivos gerais	28
3.2 Objetivos específicos	28
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Extração do óleo essencial da <i>Curcuma longa</i>	29
4.2 Avaliação da angiogênese na membrana cório-alantóide	29
4.3 Análise microbiológica	32
5 RESULTADOS	34
5.1 Atividade angiogênica	34
5.2 Atividade antimicrobiana	34
6 DISCUSSÃO	36
7 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Porcentagem de vascularização obtida com tratamento do óleo essencial da <i>C. longa</i> e controles	34
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Curcuma longa: Partes aéreas da planta. Imagem retirada e modificada a partir de Franco et al (2007).23
- Figura 2 – Aspecto dos rizomas do açafrão. Imagem retirada e modificada a partir de Franco et al (2007).24
- Figura 3 – Estrutura da CAM a partir da abertura na casca do ovo.(A) – Observa-se os detalhes da abertura de 1,0 cm de diâmetro na casca do ovo. (B) – Visão da rede vascular da Membrana corioalantóide no 13º dia de desenvolvimento, bem como, do papel de filtro (ponta da seta) que foi embebido com a substância (teste ou controles). Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixels.....30
- Figura 4 – Extensão da CAM (em vermelho) no ovo embrionado. Esquema ilustrativo das membranas que constituem o ovo embrionado de galinha. A Figura 4 foi elaborada em PowerPoint 2007 (Microsoft), de acordo com informações de Vargas et al., (2007).31
- Figura 5 – Situação após a abertura da casca e da remoção da membrana da casca para expor a CAM, utiliza-se uma fita adesiva na abertura para isolar a membrana do meio externo. A Figura 5 foi elaborada em PowerPoint 2007 (Microsoft), de acordo com informações de Vargas et al., (2007).31
- Figura 6 – Placa contendo bactérias gram positivas indicando a não formação do halo de inibição do disco contendo óleo essencial do açafrão (localizado no centro da placa) - Fotografia mostrando o halo de sensibilidade do disco de antibiótico e o papel de filtro onde foi embebido o óleo da sucupira “S”. Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixels35

Figura 7 – Placa contendo bactérias gram negativas indicando a não formação do halo de inibição do disco contendo óleo do açafreão (indicado pela seta). O disco indicado por MA refere-se ao teste realizado com extrato de outra planta sem relação com o presente estudo Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixel35

Figura 8 – Situação da rede vascular formada na CAM após o tratamento, com óleo do açafreão juntamente com os controles: A – Controle inibidor. B - Controle negativo. C – Controle positivo. D – Teste (Óleo essencial do açafreão). Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixels.36

LISTA DE ABREVIações

CAM	Membrana Corioalantóide do Ovo Embrionado de Galinha
LAS	Laboratório da Área de Saúde.
LEB	Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos
PUC-GO	Pontifícia Universidade Católica de Goiás
TGF	Fator de Crescimento Tumoral
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
bFGF	Fator de crescimento do fibroblasto
DCV	Doenças cardiovasculares
FNT- α	Fator tumoral necrótico

1 INTRODUÇÃO

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir da rede vascular preexistente. Este fenômeno representa um processo fisiológico natural do organismo humano, estando presente durante a cicatrização, reprodução e no desenvolvimento embrionário. A angiogênese também constitui uma etapa fundamental em algumas doenças, como o câncer, diabetes, artrite reumatóide e outras (Hillen; Griffioen, 2007).

Os estudos de Folkman sobre a angiogênese elucidaram a dependência do crescimento tumoral pela neovascularização (Folkman, 2003, 2006). Mais tarde, os avanços na identificação dos fatores de crescimento indutores da angiogênese proporcionaram a formulação de hipóteses a respeito da possibilidade do uso de inibidores ou ativadores da angiogênese em procedimentos terapêuticos; tratamento do câncer ou tratamento de doenças cardiovasculares, respectivamente (Cristofaro; Emanuelli, 2009; Folkman, 2006; Plate et al., 2012).

A angiogênese é uma etapa imprescindível no fenômeno da cicatrização. Algumas pesquisas de engenharia tecidual buscam o desenvolvimento de materiais de revestimento que comportam moléculas ativadoras da angiogênese e que por sua vez, reparam o tecido lesionado. Resultados otimistas têm sido alcançados com o biopolímero obtido através do látex da seringueira (Ferreira et al., 2009). Em testes in vivo, este material demonstrou ser ativador da angiogênese (Ferreira et al., 2009) e foi capaz de induzir uma reparação eficiente em esôfago de cães (Mrue, 1997, 2000) e em pericárdio de cães (Sader et al., 2000).

Outra estratégia terapêutica que envolve a ativação da angiogênese pode ser aplicada às doenças cardiovasculares. O método da terapia angiogênica baseia-se no estímulo à vascularização para normalizar o fluxo sanguíneo em tecidos

isquêmicos. Estudos clínicos da terapia angiogênica podem envolver o uso de biopolímeros, células-tronco e terapia gênica (Deveza et al., 2012).

Pesquisas recentes demonstraram que diversos extratos vegetais são capazes de induzir a angiogênese (Melo-Reis et al., 2010). Estas pesquisas evidenciam, sobretudo, que a fitoterapia oferece boas possibilidades na busca por novas alternativas terapêuticas (Prabhu, et al., 2012). A atividade angiogênica foi observada no látex da *Synadenium umbellatum* (cola-nota) (Melo-Reis et al., 2010), no látex da *Hevea brasiliensis* (seringueira) (Ferreira et al., 2009), no extrato etanólico da *Calendula officinalis* (calendula) e suas frações (Parente et al., 2011); e no extrato etanólico de *Terminalia bellirica* (Prabhu, et al., 2012).

A *Curcuma longa*, popularmente conhecida como açafrão, é uma planta de origem asiática, que se adaptou ao cultivo no Brasil. O açafrão é muito utilizado na culinária como condimento e em indústrias alimentícias e têxteis devido ao corante (curcumina) produzido pelos seus rizomas (Lorenzi; Matos, 2002; Cecilho Filho et al., 2000).

Diversas atividades biológicas do açafrão já foram cientificamente comprovadas. Estudos realizados por Liju et al. (2011) demonstraram que o óleo essencial do açafrão possui propriedades antiinflamatórias e antinoceptivas (bloqueio ao estímulo da dor). A curcumina, em particular, consiste em um polifenol altamente pleiotrópico, compatível com diversos alvos moleculares. Esta característica específica confere à curcumina a capacidade de interagir com mais de 30 proteínas diferentes (Zhou et al., 2011). Em nível molecular, a pleiotropia da curcumina justifica as múltiplas propriedades demonstradas em vários estudos tais como: anticancerígeno, proapótico, antiangiogênico, antimetastático, imunomodulatório e antioxidante (Hasima; Aggarwal, 2012).

Outras abordagens científicas têm envolvido estudos acerca da atividade antibacteriana do açafrão. A busca por substâncias naturais que inibem crescimento microbiológico tem despertado interesse nas indústrias alimentícias, como alternativas naturais para conservação de alimentos, em detrimento dos conservantes sintéticos. Além disso, o acervo botânico disponível na natureza possui forte potencial no desenvolvimento de medicamentos para tratamento de infecções, possibilitando que novas opções de tratamento sejam desenvolvidas para combater doenças causadas por microorganismos emergentes ou multirresistentes (Norajit et al., 2007; Franco et al. 2007).

Os estudos envolvendo o óleo essencial do açafrão demonstram que a substância possui atividade inibitória para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes* (Norajit et al. 2007; Franco et al. 2007). O efeito inibidor dos óleos essenciais tem relação com fenômenos alelopáticos e ecológicos na natureza. Algumas espécies de plantas produzem compostos odoríferos para atrair polinizadores enquanto que terpenos voláteis produzidos por outras plantas são fortes inibidores e atuam como mecanismo de defesa contra outras espécies prejudiciais (Simões; Spitzer, 2010).

A composição química dos óleos essenciais é bastante complexa, podendo variar de uma espécie de planta para outra. No geral, a maioria dos óleos essenciais é constituída por fenilpropanoídeos ou terpenóides, sendo que a presença de aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre também podem ocorrer (Simões; Spitzer, 2010).

O presente trabalho envolve estudos referentes à atividade angiogênica e antimicrobiana do óleo essencial do açafrão. Considerando os avanços científicos na

área da farmacognosia e os estudos que comprovam diversas atividades biológicas do açafrão e de outras plantas, o interesse pelos recursos vegetais tem se destacado nas pesquisas de desenvolvimento de medicamentos e alternativas de tratamento para inúmeras doenças. Dessa forma, espera-se que a investigação das atividades angiogênica e antimicrobiana do óleo essencial do açafrão, possam contribuir significativamente para um melhor entendimento desses fenômenos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A saúde do organismo humano depende, dentre outros fatores, de um fornecimento contínuo de sangue aos órgãos e tecidos. Somente através um complexo arranjo de vasos e capilares, os tecidos podem ser continuamente irrigados e supridos de oxigênio e nutrientes (Chu; Wang, 2012; Conway; Carmeliet, 2004). A angiogênese é a formação de vasos sanguíneos a partir de brotos endoteliais preexistentes e é um processo altamente coordenado, envolvendo a ação de diferentes tipos e sinais celulares (Chu; Wang, 2012). A angiogênese atua como resposta fisiológica de formação vascular colateral, em função de condições de isquemia (Prabhu et al., 2012).

A angiogênese no organismo é promovida por uma série de fatores indutores e inibidores que regulam o ritmo de crescimento dos vasos e mantêm equilíbrio aos processos fisiológicos no ciclo reprodutivo, no reparo e na formação tecidual, dentro das condições normais de saúde de um indivíduo (Hillen; Griffioen, 2007; Conway; Carmeliet, 2004; Kilarski et al., 2012). Por outro lado, a ocorrência desordenada e descontrolada da angiogênese é um fenômeno presente em condições patológicas, como crescimento tumoral, retinopatias, artrite reumatóide e psoríase (Kilarski et al., 2012).

De acordo com Kubota (2012) os primeiros estudos sobre a angiogênese tiveram início a mais de um século quando os pesquisadores observaram a densa rede vascular presente em tumores nos seres humanos. A mais de 70 anos, a existência de fatores angiogênicos de origem tumoral já era um postulado, sugerindo que o crescimento vascular dependia desses fatores (Kubota, 2011). Em 1971 o pesquisador Judah Folkman abriu o caminho para o estudo da angiogênese tumoral

ao destacar a importância da vascularização para o crescimento dos tumores (Kubota, 2011). O trabalho elaborado por Folkman envolvia também o questionamento sobre a possibilidade da aplicação dos inibidores da angiogênese no tratamento do câncer angiogênico dependente (Folkman, 2006; Plate, 2012).

Os avanços nos estudos da angiogênese culminaram com descoberta de fatores de crescimento, sendo que o primeiro, o fator de crescimento do fibroblasto (bFGF) foi descoberto em meados de 1980. O bFGF é produzido por muitos tipos de células, incluindo os macrófagos e as células tumorais, sendo capaz de estimular as principais etapas da angiogênese (Hillen; Griffioen, 2007).

Outro importante indutor da angiogênese, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), é considerado o mais importante fator angiogênico, tanto para desenvolvimento embrionário, quanto no crescimento tumoral. A relação direta do VEGF com o crescimento de tumores o tornou alvo principal das pesquisas para tratamento do câncer. Este novo caminho foi iniciado com as pesquisas de anticorpos monoclonais ao VEGF para bloquear o crescimento tumoral in vivo e abriu espaço para o desenvolvimento de fármacos utilizados em ensaios clínicos de câncer (Plate et al., 2012).

Outras doenças estão relacionadas com vascularização insuficiente. As doenças cardiovasculares (DCV) ocorrem devido ao impedimento ou diminuição do fluxo sanguíneo aos tecidos, seja pelo estreitamento do calibre da vascularização ou pela sua obstrução (Deveza et al., 2012).

Em relação ao órgão afetado, costuma-se atribuir às CDV diferentes classificações, como por exemplo, doença cerebrovascular, doença coronário arterial, doença arterial periférica e arteriosclerose aórtica. Muitos locais afetados pela isquemia são críticos, tornando as CDV potencialmente letais (Deveza et al.,

2012).

No Brasil, estima-se segundo Mansur e Favarato (2012) que o risco de morte, associado à doença cerebrovascular foi de 128,85 (homens) e 91,12 (mulheres) por 100 mil habitantes em 2009. Neste mesmo ano, os dados referentes ao risco de morte por doença isquêmica do coração foram de 222,10 (homens) e 110,28 (mulheres) por 100 mil habitantes.

Tratamentos convencionais para doenças cardiovasculares envolvem procedimentos cirúrgicos ou administração de fármacos. Medicamentos destinados ao tratamento da isquemia agem por meio da diminuição do ritmo cardíaco com o objetivo de diminuir a demanda de oxigênio, ou aumentam a vazão sanguínea pelo aumento da dilatação do músculo liso vascular. Intervenções cirúrgicas ocorrem em casos mais severos onde a obstrução vascular é completa, sendo que neste caso, são utilizados extensores vasculares nos locais afetados (Deveza et al 2012). Apesar dos avanços e cuidados durante as cirurgias, ocorrência de complicações pulmonares é comum nestes casos. Estima-se, segundo os estudos de Ortiz et al (2010) que de 202 pacientes observados, 90 desenvolveram problemas pulmonares.

Considerando todos os problemas associados às CDV, a terapia angiogênica constitui uma área de pesquisa com muita relevância clínica. A possibilidade de recompor a vascularização por meio da terapia angiogênica em tecidos afetados pela isquemia, tem atraído esforços científicos nas últimas duas décadas (Chu; Wang, 2012).

Esta hipótese foi bem fundamentada com os estudos de Takeshita et al (1994). Em seu trabalho, após a excisão da artéria femoral ipsilateral em coelhos para indução da isquemia, foi administrado doses em torno de 500 a 1000 μ g de VEGF. Observou-se um aumento significativo do desenvolvimento colateral dos vasos e,

conseqüentemente, uma redução da isquemia em animais tratados com VEGF em comparação com os grupos controle. Os autores concluíram que o VEGF possui potencial terapêutico, sugerindo que outras investigações devem esclarecer se o VEGF é adequado ao tratamento de pacientes com problemas graves de oclusão vascular.

A angiogênese tem grande importância na pesquisa de procedimentos terapêuticos de cicatrização. O desenvolvimento de materiais bioativos que veiculam ativadores da angiogênese para promover reparo de um tecido lesionado trouxe resultados promissores na pesquisa da engenharia tecidual (Ferreira et al., 2009). De acordo com o trabalho realizado por Mrué (2000), foi observado que o látex da seringueira (*Havea brasiliensis*) aplicada na forma de uma prótese que substituiu uma parte do esôfago removida de um cão obteve um resultado satisfatório na cicatrização e regeneração tecidual. Ferreira et al (2009) testou a atividade angiogênica da membrana obtida a partir do látex da seringueira em diferentes temperaturas de tratamento da membrana, comprovando que a ativação da angiogênese é máxima para a faixa de temperatura de tratamento entre 65°C a 85°C.

O látex da seringueira constitui uma matriz rica em constituintes orgânicos. Estima-se que entre 1% a 1,5% do látex é composto por proteínas que são removidas em grande parte durante a fabricação da borracha natural (Ferreira et al 2009). Ferreira et al (2009) também investigou a atividade angiogênica do soro separado da borracha, concluindo a fração proteica separada da borracha é a principal responsável pela atividade angiogênica do látex. Supõe-se que a variação observada na atividade angiogênica, em função da temperatura, ocorre pela alteração da estrutura secundária dos constituintes no soro.

Estudos têm demonstrado que extratos de certas plantas possuem atividade angiogênica (Melo-Reis, 2010). No trabalho realizado por Parente et al (2011) a angiogênese foi observada para os extratos das flores de *Calendula officinalis* em modelos experimentais de membrana corioalantoide (CAM) e em feridas induzidas em ratos. Outro trabalho realizado por Melo-Reis et al (2010) demonstrou pelo método da CAM que o látex da cola-nota (*Synadenium umbellatum*) apresentou atividade angiogênica.

A pesquisa de novos procedimentos para o tratamento de doenças cardiovasculares e cicatrização direcionou esforços científicos na busca por ativadores da angiogênese (Ferreira et al 2009). Seja no estudo da engenharia tecidual ou da terapia angiogênica, o uso de ativadores da angiogênese apresentou resultados otimistas na cicatrização e na recomposição vascular em tecidos isquêmicos (Ferreira et al 2009; Chu; Wang, 2012). Por outro lado, ainda existe carência de pesquisas sobre recomposição vascular de tecidos isquêmicos através da aplicação de extratos vegetais que induzem a angiogênese. Até o momento, a terapia angiogênica tem investigado o uso de biomateriais poliméricos, células tronco, terapia gênica (Deveza et al., 2012) e fatores de crescimento (Chu; Wang, 2012).

O desenvolvimento de metodologias de avaliação e quantificação da rede vascular possibilita que a angiogênese possa ser detalhadamente estudada, objetivando sua possível aplicação no tratamento de doenças cardiovasculares (Prabhu, et al., 2012), problemas de cicatrização (Ferreira et al 2009) e câncer (Yi et al., 2012). Entretanto, como alerta Conway e Carmeliet (2004), é arriscado afirmar que a simples aplicação de fatores indutores ou inibidores da angiogênese, é segura e eficaz para o tratamento das doenças. Deve-se atentar para as distintas

características morfológicas das células endoteliais vasculares em diferentes órgãos e a forma como cada fator pró ou antiangiogênico afeta os órgãos e a vascularização.

2.1 Potencial farmacológico do açafrão

O açafrão (*Curcuma longa*) alcançou uma posição de destaque no mercado graças aos constituintes químicos extraídos a partir dos seus rizomas. Além da raiz do açafrão possuir utilidade como condimento na culinária tradicional da Índia e de outros países, a curcumina, um corante natural de coloração amarela extraído do açafrão, é utilizada pela indústria alimentícia e têxtil como substitutos dos corantes sintéticos (Cecílio Filho et al., 2000).



Figura 1 – *Curcuma longa*: Partes aéreas da planta. Imagem retirada e modificada a partir de Franco *et al* (2007).

A história da utilização fitoterápica do açafrão parece ter iniciado no sistema tradicional de medicina secular da Índia denominado Ayurveda (Luthra et al., 2001; Kumar et al., 2007). Na medicina popular indiana, o açafrão é utilizado para alívio de dores, inchaços, tratamento de ferimentos e inflamações. Diversos estudos

científicos comprovam uma grande variedade de atividades biológicas associadas às substâncias extraídas do açafrão (Luthra et al., 2001).

O principal constituinte, a curcumina consiste em uma substância de coloração amarela à alaranjada, extraída a partir dos rizomas do açafrão (Zhou et al., 2011). A curcumina é um polifenol hidrofóbico conhecido como diferuloilmetano. Este composto é o representante majoritário de uma família de moléculas encontradas no açafrão, denominadas curcuminoides. Outros curcuminoides são encontrados em concentrações mais baixas e diferem molecularmente entre si nas substituições metoxilas no anel aromático. Em função de suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas, a curcumina possui potenciais terapêuticos no tratamento de doenças cardiovasculares, pulmonares, neurológicos, doenças dermatológicas, doenças hepáticas e inibe a inflamação, angiogênese, a formação de tumores e a diabetes (Rajasekaran, 2011).



Figura 2 – Aspecto dos rizomas do açafrão. Imagem retirada e modificada a partir de Franco *et al* (2007).

De acordo com a revisão elaborada por Rjasekaran (2011), a curcumina oferece ótimo potencial no tratamento de diversos tipos de câncer e inflamações. Além disso, em função da elevada biodisponibilidade no trato gastrointestinal, foram demonstradas atividades terapêuticas para inflamação intestinal, fibrose hepática e câncer gastrointestinal.

Ao testar a atividade da curcumina em pancreatite aguda induzida em ratos, Yu *et al* (2011) demonstrou que a substância foi capaz de diminuir a lesão no pâncreas, além de ter revertido o aumento da amilase sérica, e das citocinas inflamatórias que induzem a severidade da pancreatite, tais como o fator tumoral necrótico- α (FNT- α) e o fator nuclear- κ B-p65 (FN- κ B-p65).

A multiplicidade de atividades biológicas associadas à curcumina deve-se à característica desta molécula ser capaz de regular vários alvos moleculares tais como fatores de transcrição, fatores de crescimento, quinases, citocinas inflamatórias e etc (Zhou *et al.*, 2011).

No trabalho realizado por Liju *et al* (2011) foi verificado o efeito antioxidante, antiinflamatório e antinociceptivo do óleo essencial do açafrão. A metodologia para avaliação da atividade antioxidante envolveu escalas *in vitro*, por seis métodos diferentes de eliminação do radical e *in vivo* por inibição de geração de superóxido de macrófagos ativados com phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) em ratos. Os resultados demonstraram que o óleo essencial do açafrão possui atividade antioxidante. Liju *et al* (2011) sugere que tal fenômeno pode ocorrer pela presença do ar-turmerone, sendo o constituinte majoritário identificado no óleo essencial. Em relação ao efeito antinociceptivo, a administração intraperitoneal de 1000mg/Kg por quilo de peso corporal foi capaz de inibir em 69,48% as contrações abdominais. Tal resultado foi muito próximo do efeito inibidor de 70,93%, obtido pelo grupo positivo da aspirina (10mg/kg). O efeito inibidor do óleo essencial do açafrão no edema de pata em ratos foi capaz de reduzir a inflamação em até 50% com a aplicação de 1000mg/kg de óleo essencial. Este resultado aproximou-se do controle com diclofenaco (10mg/kg).

Outros trabalhos avaliaram a atividade antimicrobiana do açafrão. A busca por

substâncias naturais capazes de inibir o crescimento de microrganismos sustenta-se na possibilidade da aplicação como medicamentos ou alternativas naturais para conservação dos alimentos em relação aos conservantes sintéticos (Norajit et al., 2007).

O estudo realizado por Franco et al (2007) avaliou as atividades antimicrobianas de óleos essenciais extraídos da alfazema (*Aloysia gratíssima*), da alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum*) e do açafrão. Foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraeseus* e *Escherichia coli* isolada de fezes diarreicas de crianças, para a realização do experimento. Os resultados demonstraram que o óleo essencial do açafrão inibiu crescimento do *Staphylococcus aureus*. Este resultado foi superior ao controle positivo do antibiótico cloranfenicol. Por outro lado, o óleo essencial do açafrão não produziu efeito inibidor sobre *Escherichia coli* e *Salmonella choleraeseus*.

Outro trabalho que investigou a atividade antimicrobiana do óleo essencial do açafrão foi realizado por Norajit et al (2007). O experimento foi realizado para cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Os diâmetros dos halos de inibição obtidos para o óleo essencial do açafrão, em cada uma das cepas foram respectivamente: 9mm, 10mm, 0mm e 16mm.

Norajit et al (2007) explica que a variação da sensibilidade dos microrganismos pode ocorrer em virtude da tolerância de cada cepa em relação aos constituintes do óleo essencial. Na avaliação fitoquímica do óleo essencial do açafrão, Norajit et al (2007) constatou a presença de sesquiterpenos como turmerona, curlona, α -farneseno e α -zingibereno. Considerando a característica hidrofóbica desses constituintes, presume-se que um possível mecanismo de ação sobre os

microorganismos ocorra sobre as membranas citoplasmáticas, na coagulação dos constituintes celulares, e no desequilíbrio da força motriz de prótons (Norajit et al.,2007).

De acordo com Liju et al (2011), o óleo essencial do açafrão representa um conjunto único de sesquiterpenoides com significativos resultados farmacológicos. Outros estudos envolvendo o óleo essencial do açafrão demonstraram atividade repelente aos insetos, antibacteriana, antimutagênica e anticarcinogênica (Liju et al., 2011).

Avanços notáveis no estudo do potencial farmacológico do açafrão indicam um amplo espectro de atividades biológicas e demonstram que o óleo essencial do açafrão possui atividade antimicrobiana para algumas espécies de cepas bacterianas. Novos enfoques científicos são necessários para tornar a aplicação do açafrão como ativo antimicrobiano ainda mais consistente.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar as atividades angiogênica e antimicrobiana do óleo essencial da *Curcuma longa* (açafrão).

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 – Avaliar da atividade angiogênica do óleo essencial do açafrão, utilizando como modelo experimental a membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha (*Gallus domesticus*).

3.2.2 – Avaliar da atividade antimicrobiana do óleo essencial do açafrão em bactérias gram negativas (*Escherichia coli*) e em bactérias gram positivas (*Staphylococcus simulans*).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Extração do óleo essencial da *Curcuma longa*

O procedimento para extração do óleo essencial do açafrão foi adaptado do método de hidrodestilação apresentado por Santos *et al.* (2004). Para evitar perdas significativas e minimizar erros durante o processo, a operação ocorreu em circuito fechado, com o auxílio do aparato de Clevenger (Santos *et al.*, 2004).

Em um balão de vidro de fundo redondo de volume de 1000 ml foi adicionado 150 g do pó dos rizomas do açafrão. Acrescentou-se água destilada até completar a metade do volume do balão. Em seguida, acoplou-se a coluna destiladora no balão e a mangueira do destilador na entrada de água.

Manteve-se o processo de destilação por um período de 180 minutos. Ao encerrar o aquecimento da manta, foi verificada no tubo separador a formação das duas fases que correspondem à fase aquosa, retida na parte inferior do tubo e a fase oleosa, retida na parte superior do tubo separador. O óleo foi armazenado sob refrigeração, ao abrigo da luz e em um tubo de vidro previamente esterilizado e identificado

4.2 Avaliação da angiogênese na membrana cório-alantóide

A avaliação da atividade angiogênica do óleo essencial da *Curcuma longa* na membrana corioalantóide (CAM) do ovo embrionado de galinha foi realizada no Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos (LEB), do Mestrado de Ciências Ambientais e Saúde, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

Foram utilizados 60 ovos férteis de galinha (*Gallus domesticus*) da linhagem

Rhoss. Os ovos foram incubados em estufa automática durante cinco dias a 37° C ($\pm 1^\circ$ C) e com umidade entre 60 e 70% para a formação da CAM (Ribatti *et al.*, 2000).

No quinto dia de incubação foi realizada uma abertura circular de 1,0 cm de diâmetro na casca do ovo em sua base maior, com auxílio de uma micro-retífica da marca Dremel, como mostrado na Figura 3. Posteriormente, foi retirada a membrana da casca com o objetivo de expor a CAM e os ovos foram novamente incubados nas mesmas condições, conforme a técnica de ensaio utilizada por Melo-Reis *et al.* (2010).

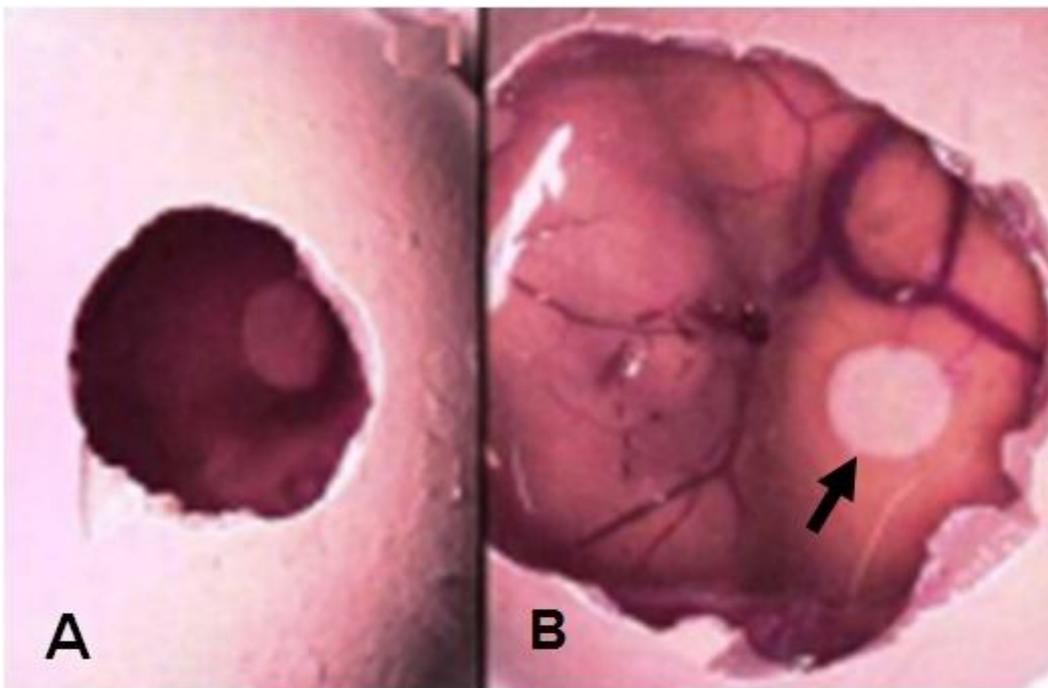


Figura 3 – Estrutura da CAM a partir da abertura na casca do ovo. (A) – Observa-se os detalhes da abertura de 1,0 cm de diâmetro na casca do ovo. (B) – Visão da rede vascular da CAM no 13° dia de desenvolvimento, bem como, do papel de filtro (ponta da seta) que foi embebido com a substância (teste ou controles). Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixels.

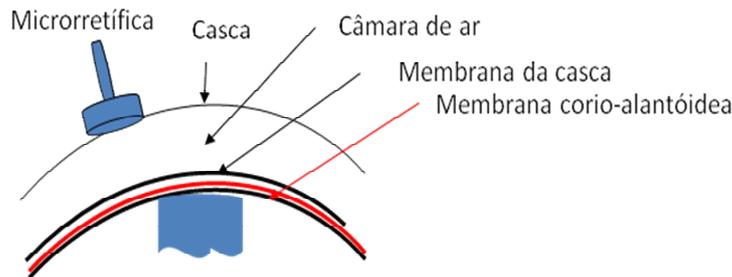


Figura 4 – Extensão da CAM (em vermelho) no ovo embrionado. Esquema ilustrativo das membranas que constituem o ovo embrionado de galinha. A Figura 4 foi elaborada em PowerPoint 2007 (Microsoft), de acordo com informações de Vargas et al., (2007).

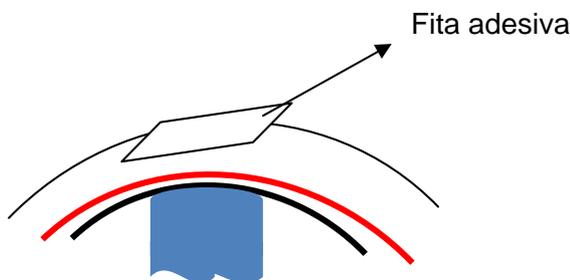


Figura 5 – Situação após a abertura da casca e da remoção da membrana da casca para expor a CAM, utiliza-se uma fita adesiva na abertura para isolar a membrana do meio externo. A Figura 5 foi elaborada em PowerPoint 2007 (Microsoft), de acordo com informações de Vargas et al., (2007).

Ao final do 13º dia de incubação, os discos de papel de filtro estéreis foram embebidos com 5 µL do óleo essencial. Do mesmo modo foram preparados os discos dos controles positivo (biocure), negativo (água destilada) e inibidor (dexametazona). Os materiais, teste e controles foram colocados diretamente sobre a CAM, permanecendo até o 16º dia (Figura 1B). Em seguida, as CAM's foram fixadas em solução de formol (3,7 % v/v) por 10 minutos, cortadas detalhadamente e mantidas em placa de Petri com solução de formol.

As CAM's foram fotografadas sobre um fundo azul claro, em tamanho 640X480 pixels e formato RGB 24 bites, padronizados com objetivo de analisar e quantificar a rede vascular formada.

Através da imagem capturada foi realizada a análise e a quantificação da rede vascular neoformada. Determinou-se a área percentual de cada ensaio usando programas Gimp for Windows (version 2.0.5) e Imagem J (versão 1.28). As imagens foram preparadas de forma que a saturação, brilho e contraste permitiram uma melhor resolução dos vasos sanguíneos que foram quantificados em pixels correspondentes. A quantidade dos pixels selecionada é proporcional ao nível de vascularização do campo de imagem capturada segundo metodologias descritas por Mendonça (2004), Doukas (2006 a), Doukas (2006 b) e é composto por pontos que geram a impressão óptica de preenchimentos sólidos, cada um desses pontos é chamado de pixel (*picture element*).

A atividade angiogênica do óleo essencial do açafraão e as porcentagens das áreas obtidas da CAM dos grupos tratados e controles foram comparados por Kruskal-Wallis (análise de variância - ANOVA) e posteriormente comparação múltipla (Método de Dunn). O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.3 Análise microbiológica

O procedimento de análise da atividade antimicrobiana do óleo essencial do açafraão foi adaptado do procedimento realizado por Franco *et al.* (2007).

Foram cultivadas duas cepas de bactérias gram positiva (*Staphylococcus simulans*) e gram negativa (*Escherichia coli*) em duas placas de petri identificadas. Em seguida, dentro de uma capela de fluxo laminar foi executado o procedimento de disco difusão para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial do açafraão. O procedimento foi realizado no Laboratório da Área de Saúde (LAS) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUG-GO).

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada por flambagem, retirou-se

material da colônia isolada transferindo para uma ampola contendo meio de suspensão da marca Biomérieux até que a turvação alcançasse o valor de 0,5 da escala Mc. Farland.

Em seguida, mergulhou-se a ponta de um swab esterilizado no meio de suspensão e inoculou-se as cepas em uma placa de Petri contendo o meio Ágar Mueller-Hinton mantendo as estrias mais próximas possível, com movimentos na vertical e na horizontal. A inoculação foi feita para as cepas gram positivas e gram negativas, cada uma em suas respectivas placas de petri identificadas.

Em cada placa de petri foram aplicados dois discos contendo antibióticos conhecidos. Para a placa com a cultura de *Staphylococcus simulans* foi aplicado um disco contendo vancomicina (sensível) e outro contendo ampicilina (resistente). Na placa contendo *Escherichia coli* aplicou-se um disco contendo cefalotina (resistente) e outro contendo ertapenem (sensível). Em cada uma das placas de petri, foi adicionado um disco contendo o óleo essencial do açafraão.

5 RESULTADOS

5.1 Atividade angiogênica

Os resultados obtidos da porcentagem de vascularização na CAM após o tratamento com o óleo essencial do açafrão juntamente com os controles negativo, indutor e inibidor estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Porcentagem de vascularização obtida com tratamento do óleo essencial da *C. longa* e controles.

Identificação numérica das CAM's	Contrôle Positivo - Biocure	Contrôle Negativo H ₂ O	Contrôle inibidor Dexametazona	Óleo essencial <i>Curcuma longa</i>
1	49,6	33,4	9,6	42,3
2	52,2	32,1	15,3	38,7
3	56,5	40,1	14,8	44,2
4	59,4	33,9	12,8	39,5
5	55,6	29,4	11,5	47,1
6	52,5	37,6	11,9	45,2
7	60,1	28,3	10,8	43,4
8	54,9	35,9	14,2	47,8
9	56,4	32,3	10,2	44,9
10	48,5	30,7	11,9	41,1
11	48,6	29,4	14,5	39,9
12	48,9	29,3	12,1	38,5
13	50,2	32,1	11,3	37,1
14	47,2	36,2	9,2	40,3
15	58,4	28,7	14,7	43,6
Média	53,3	32,6	12,3	42,2
Desvio Padrão	4,3	3,6	2,0	3,3

5.2 Atividade antimicrobiana

Conforme apresentado na Figura 3 e na Figura 4, não houve formação de halo de inibição nos discos contendo óleo essencial do açafrão tanto no cultivo de bactérias gram negativas quanto no de bactérias gram positivas.

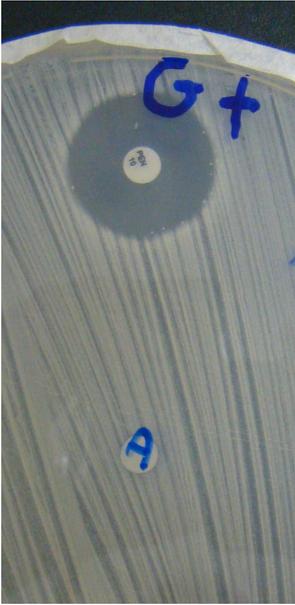


Figura 6 – Placa contendo bactérias gram positivas indicando a não formação do halo de inibição do disco contendo óleo essencial do açafão (localizado no centro da placa) - Fotografia mostrando o halo de sensibilidade do disco de antibiótico e o papel de filtro onde foi embebido o óleo da sucupira “S”. Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixels.

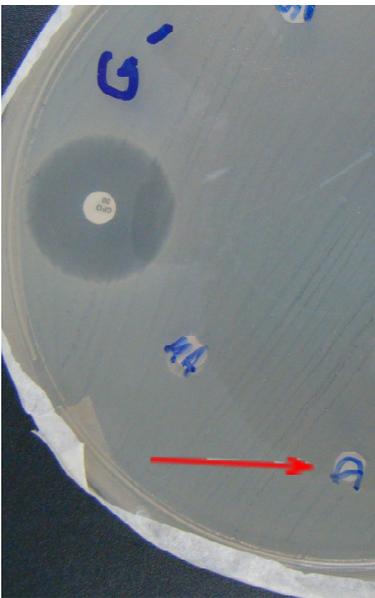


Figura 7 – Placa contendo bactérias gram negativas indicando a não formação do halo de inibição do disco contendo óleo do açafão (indicado pela seta). O disco indicado por MA refere-se ao teste realizado com extrato de outra planta sem relação com o presente estudo. Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixels.

6 DISCUSSÃO

De acordo com os dados apresentados na Tabela 1, observa-se que o grupo teste referente ao óleo essencial do açafraão apresentou a porcentagem de formação da rede vascular (atividade angiogênica) superior aos controles negativo ($p < 0,05$) e também do inibidor ($p < 0,05$). Quando comparados o controle indutor e o óleo essencial com o controle negativo, a diferença foi significativa ($p < 0,05$). Portanto, o óleo essencial e Biocure apresentaram aumento significativo da área percentagem da rede vascular formada. Observou-se também que o controle inibidor apresentou significativa redução da vascularização na CAM do ovo embrionado de galinha em relação ao controle negativo ($p < 0,005$). As imagens apresentadas na Figura 5 mostram a formação da rede vascular nos controles e no tratamento com o óleo essencial do açafraão.

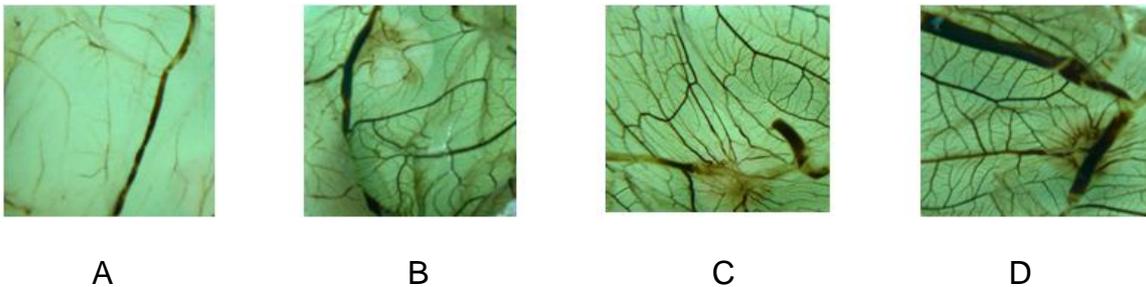


Figura 8 – Situação da rede vascular formada na CAM após o tratamento, com óleo do açafraão juntamente com os controles: A – Controle inibidor. B - Controle negativo. C – Controle positivo. D – Teste (Óleo essencial do açafraão). (Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 6.0 mega pixels).

A CAM dos ovos embrionados de galinha apresentam densa rede vascular, sendo sensível aos estímulos tanto angiogênicos quanto antiangiogênicos (Ribatti, et al., 2000; Folkman; Klagsbrun, 1987). A CAM consiste de três camadas: ectodérmica, mais externa e que exibe um denso plexo de capilares sanguíneos a partir do 12^o dia de desenvolvimento; a mesenquimal, intermediária, contendo as

grandes veias e artérias; e a endodérmica mais interna, ausente de vasos sanguíneos (Ausprunk *et.al.*, 1974; Olivo *et.al.*, 1992). Como menciona Staton *et al.* (2004), as atividades angiogênicas das substâncias químicas podem ser avaliadas contando-se os números de vasos sanguíneos em uma determinada área da CAM. O aumento da rede vascular implica na ativação de fatores angiogênicos presente no óleo essencial.

A CAM de ovo de galinha vem sendo usada para avaliar a atividade angiogênica de diversos tipos de substâncias. Assim, é possível medir tanto a indução como a inibição dessa atividade (Folkman; Haudenschild, 1980; Ribatti *et al.*, 2000). Muitos indutores da atividade angiogênica, foram identificados, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), Fator de Crescimento Tumoral (TGF), angiogenina, angiotropina, angiopoetina-1 trombospondina e outras (Folkman; Klagsbrun, 1987). Além dessas substâncias, produtos de originados dos vegetais podem tanto induzir quanto inibir a atividade angiogênica. Estudos envolvendo o látex da *Havea brasiliensis* evidenciaram que a substância apresenta atividade angiogênica (Mrué, 1997; Mrué, 2000; Sader *et al.*, 2000; Oliveira *et al.*, 2003).

Em relação à avaliação da atividade antimicrobiana, o resultado que corresponde à ausência de halo de inibição do o óleo essencial do açafração para as bactérias gram negativas (*Escherichia coli*), está de acordo com o estudo realizado por Franco *et al.* (2007). e por Norajit *et al.* (2007).

Por outro lado, Franco *et al.* (2007) afirmou que o óleo essencial do açafração poderia possuir atividade inibidora específica para bactérias gram positivas. Ao realizar o teste com *Staphylococcus aureus*, foi constatado que o óleo essencial produziu um halo de inibição de 12mm de diâmetro.

Em relação ao teste de inibição de bactérias gram positivas utilizando

Staphylococcus simulans, foi observado que o óleo essencial do açafão não produziu nenhum efeito inibidor. Este resultado demonstra que a atividade antimicrobiana do óleo essencial do açafão não ocorre para todas as bactérias gram positivas, conforme a hipótese levantada por Franco *et al.* (2007).

7 CONCLUSÕES

- 1) O óleo essencial do açafrão apresentou atividade angiogênica quando aplicado sobre a CAM.

- 2) O óleo essencial do açafrão não produziu efeito inibidor sobre a colônia bactérias gram negativas (*Escherichia coli*) e sobre bactérias gram positivas (*Staphylococcus simulans*).

REFERÊNCIAS¹

Ausprunk D.H, Knighton DR, Folkman J. Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev. Biol.* 1974; 38(2): 237-48.

Cecílio Filho AB, Souza RJ, Braz LT, Tavares M. Cúrcuma: planta medicinal, condimentar e de outros usos potenciais. *Ciência Rural.* 2000 abr; 30(1): 171-175.

Chu H, Wang Y. Therapeutic angiogenesis: controlled delivery of angiogenic factors. *Therapeutic Delivery.* 2012 June; 3(6): 693-714.

Conway EM, Carmeliet P. The diversity of endothelial cells: a challenge for therapeutic angiogenesis. 2004 Jan; 5(2): 207.

Cristofaro B, Emanuelli C. Possible novel targets for therapeutic angiogenesis. *Current Opinion in Pharmacology.* 2009 April; 9(2): 102-108.

Deveza L, Choi J, Yang F. Therapeutic angiogenesis for treating cardiovascular diseases. *Theranostics.* 2012 August; 2(8): 801-814.

Doukas CN, Maglogiannis I, Chatzioannou A, Loutrari H. A Computer Based Tool for Tumor Growth and Inhibition Detection using Angiogenesis Quantification. *IEEE International Special Topic Conference on Information Technology in Biomedicine – Ioannina: Greece.* 2006a jun. 6p. [citado 2012 Dez 03]; Disponível em: <http://medlab.cs.uoi.gr/itab2006/proceedings/Medical%20Imaging/77.pdf>.

Doukas, C. N.; Maglogiannis, I.; Chatzioannou, A.; Papapetropoulos, A. Automated Angiogenesis Quantification through advanced Image Processing Techniques. 2006b. *Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS Annual International Conference of the IEEE.* New York City, USA, Aug. 2006 On 30-Sept 3, 2345-2348.

Ferreira M, Mendonça RJ, Coutinho-Neto J, Mulato M. Angiogenic properties of natural rubber látex biomembranes and the serum fraction of *Havea brasiliensis*. *Brazilian Journal of Physics.* 2009 sep; 39(3): 564-569.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver

Folkman J, Haudenschild, C. Angiogenesis in vitro. Nature. 1980 dec; 228(5791): 551-556.

Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. Science. 1987 jan; 235(4787): 442-447.

Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process. Current Molecular Medicine. 2003; 3(7): 643-651.

Folkman J. Angiogenesis. Annual Review of Medicine. 2006 ; 57: 1-18.

Franco ALP, Oliveira TB, Ferri PH, Bara MTF, Paula JR. Avaliação da composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aloysia gratissima* (Gillies & Hook) Tronc. (alfazema), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca-cravo) e *Curcuma longa* L. (açafreão). Revista Eletrônica de Farmácia. 2007; 4(2): 208-220.

Hasima N, Aggarwal BB. Cancer-linked targets modulated by curcumin. International Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 2012 Dec; 3(4): 328-351.

Hillen F, Griffioen AW. Tumor vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. Cancer and Metastasis Reviews. 2007 dec; 26(3-4): 489-502.

Kilarski WW, Petersson L, Fuchs PF, Zielinski MS, Gerwins P. An *in vivo* neovascularization assay for screening regulators of angiogenesis and assessing their effects on pre-existing vessels. 2012 dec; 15(4): 643-655.

Kubota Y. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. Keio Journal of Medicine. 2012; 61(2): 47-56.

Kumar B, Vijayakumar M, Govindarajan R, Pushpangadan P. Ethnopharmacological approaches to wound healing – Exploring medicinal plants of India. Journal of Ethnopharmacology. 2007 aug; 114(2): 103-113.

Liju VB, Jeena K, Kuttan R. An evaluation of antioxidant, anti-inflammatory and antinoceptive activities of essential oil from *Curcuma longa* L. Indian Journal of Pharmacology. 2011 Sep-Oct; 43(5): 526-531.

Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002. 512p.

Luthra PM, Singh R, Chandra R. Therapeutics uses of *Curcuma longa* (Turmeric). Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2001; 16(2): 153-160.

Mansur AP, Favarato D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2012 mar; 99(2): 7p.

Melo-Reis PR, Andrade LS, Silva CB, Araújo LMM, Pereira MS, Mrué F, Chen-Chen L. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax látex. Brazilian Journal of Biology. 2010 fev; 70(1): 189-194.

Mendonça RJ. Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira – *Hevea brasiliensis*. Tese de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. 2004.

Mrué, F. Substituição do Esôfago Cervical por Prótese Biossintética de Látex - Estudo Experimental em Cães [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP; 1997.

Mrué, F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade em neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. 2000.

Norajit K, Laohakunjit N, Kerdchoechuen O. Antibacterial effect of five zingiberaceae essential oils. Molecules. 2007 Aug; 12(8): 2047-2060.

Oliveira JAA, Hyppolito MA, Coutinho-Netto J. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. Rev. Bras. Otorrinolaringol. 2003 out; 69 (5), 649-655.

Olivo MB, Hardwa JR, Schulze-Osthoff K, Sorg C, Jacob HJ, Flamme I. A comparative study on the effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha), human angiogenic factor (h-AF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on the chorioallantoic membrane of the chick embryo. Anatomical Record. 1992 sep; 234(1), 105-115.

Ortiz LDN, Schaan CW, Leguisamo CP, Tremarin K, Mattos WLL, Kalil RAK, Pellanda LC. Incidence of pulmonary complications in myocardial revascularization. Arquivos Brasileiros de Cardiologia. 2010 fev; 95(4): 441-447.

Parente LML, Andrade MA, Brito LAB, Moura VMDB, Miguel MP, Lino-Júnior RS, Tresvenzol LFM, Realino de Paula J, Paulo NM. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2011 April; 26(1): 19-24.

Plate KH, Scholz A, Dumont DJ. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathologica*. 2012 December; 124(6): 763-775.

Prabhu VV, Chidambaranathan N, Gopal V. Evaluation and quantification of angiogenesis activity of *Terminalia bellirica* Roxb, by mice sponge implantation method. *Journal of Young Pharmacists*. 2012 Jan-Mar; 4(1): 22-27.

Rajasekaran SA. Therapeutic potencial of curcumin in gastrointestinal diseases. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*. 2011 feb; 2(1): 1-14.

Ribatti R, Vacca A, Roncali L, Dammacco F. The Chick Embryo Chorioallantoic Membrane as a Model for in vivo Research on Anti-Angiogenesis. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2000 jul; 1(1):73-82.

Sader SL, Coutinho-Netto J, Barbieri-Neto J, Mazzetto AS, Alves-Jr P, Vanni JC, Sader AA. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2000 dez; 15(4): 338-344.

Santos AS, Alves SM, Figueredo FJC, Neto OGR. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Comunicado Técnico. 2004 nov; 99: 1-6.

Simões CMO, Spitzer V. Óleos voláteis. In: Simões C, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR organizadores. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6a. ed. Florianópolis: UFSC; 2010. p. 107-122.

Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *International Journal of Experimental Pathology*. 2004 oct; 85(5): 233-248.

Vargas A, Zeisser-Labouèbe M, Lange N, Gurny R, Delie F. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007 sep; 59(11): 1162-1176.

Yi JM, Park JS, Oh SM, Lee J, Kim J, Oh DS, Bang OS, Kim NS. Ethanol extract of *Gleditsia sinensis* thorn suppresses angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. BMC Complementary and Alternative Medicine. 2012 dec; 12: 243.

Yu WG, Xu G, Ren GJ, Xu X, Yuan HQ, Qi XL, Tian KL. Preventive action of curcumin in experimental acute pancreatitis in mouse. Indian Journal of Medicinal Research. 2011 nov; 134 (5): 717-724.

Zhou H, Beevers CS, Huang S. Targets of curcumin. Current Drug Targets. 2011 March; 12(3): 332-347.