



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1070 • Fax: (62) 3946.1070
www.pucgoias.edu.br • prope@pucgoias.edu.br

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA**

**ATA DA SESSÃO DE APRESENTAÇÃO E DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE
CONCLUSÃO DE CURSO DE MESTRADO**

1 No dia 12 de março de 2015, reuniu-se a 106ª Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado,
2 composta pelos membros: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis / PUC Goiás, Prof. Dr. Darlan Tavares
3 Feitosa/PUC Goiás; Profa. Dra Fátima Mrue/FM-UFG, para avaliação da dissertação intitulada
4 "Avaliação das atividades agiogênica e mutagênica da solução aquosa da *Tebebuia impetiginosa*
5 (Ipê Roxo).", do candidato Paulo Sávio Paim de Moraes, aluno do Mestrado em Genética (MGene) da
6 Pontifícia Universidade Católica de Goiás. A sessão iniciou-se às 14h40min., na Sala de Defesa de
7 Teses, da área IV, sob a presidência do Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis, que concedeu 30 minutos
8 ao candidato para expor sinteticamente o estudo. A seguir, a arguição procedeu-se de forma interativa.
9 Ao final da defesa, a sessão foi suspensa e a Comissão se reuniu em separado para avaliação e atribuição
10 de nota. Discutido o trabalho e o desempenho do mestrando, a Banca Examinadora considerou-o
11 APROVADO com a nota 9,0 (NOVE) equivalente ao
12 conceito "...A...". Portanto, o discente foi declarado Mestre em Genética pela Pontifícia Universidade
13 Católica de Goiás, pelo Presidente da Banca Examinadora, que encerrou a sessão às 16h30min.
14 Não havendo nada mais a tratar, a presente ata foi lavrada e assinada pelos membros da Banca
15 Examinadora.

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis / PUC Goiás _____

Prof. Dr Darlan Tavares Feitosa/PUC Goiás _____

Profa. Dra Fátima Mrue/UEG _____

Esta ata contém 19 linhas contínuas, sem rasuras, emendas ou retificação.



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM GENÉTICA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, MUTAGÊNICA
E ANTIMUTAGÊNICA DA SOLUÇÃO AQUOSA DA *Tabebuia
impetiginosa* (Ipê roxo).**

PAULO SÁVIO PAIM DE MORAES

Goiânia - GO

Março/2015

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM GENÉTICA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, MUTAGÊNICA
E ANTIMUTAGÊNICA DA SOLUÇÃO AQUOSA DA *Tabebuia
impetiginosa* (Ipê roxo).**

PAULO SÁVIO PAIM DE MORAES

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis

Goiânia-GO

Março/2015

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

M827a Moraes, Paulo Sávio Paim de.
Avaliação das atividades angiogênica, mutagênica e antimutagênica da solução aquosa da *Tabebuia impetiginosa* (ipê roxo) [manuscrito] / Paulo Sávio Paim de Moraes – Goiânia, 2015.
xii, 45 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Genética, 2015.

“Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis”.
Bibliografia.

1. Neovascularização. 2. Nucleolo. I. Título.

CDU 575(043)

ATA COMPLEMENTAR Nº 106/2015

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: PAULO SÁVIO PAIM DE MORAES

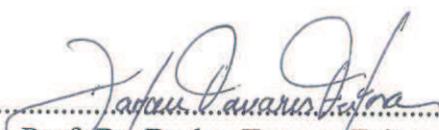
DEFENDIDA EM 12 DE MARÇO DE 2015 E APROVADA COM CONCEITO...A.....

O título foi alterado () não () sim _____

BANCA EXAMINADORA



.....
Prof Dr. Paulo Roberto de Melo Reis
(presidente-orientador)



.....
Prof. Dr. Darlan Tavares Feitosa / PUC Goiás
(membro interno)



.....
Profa. Dra. Fátima Mrue / FM-UFG
(membro externo)

DEDICATÓRIA

A minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda de meus eternos pais Elisena Paim e Manoel Moraes que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de extenso amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e de procurar sempre em Deus à força maior para o meu desenvolvimento como ser humano. Por essa razão, gostaria de dedicar e reconhecer a vocês, minha imensa gratidão e sempre amor.

À Deus, dedico o meu agradecimento maior, porque têm sido tudo em minha vida.

Dedico este trabalho à minha querida companheira Kauany Brandão e ao meu ídolo Marcos Fernando, que permaneceram ao meu lado, nos bons e maus momentos; ao meu querido irmão Bruno Paim. A todos eles eu agradeço por compreender-me e ensinar-me para que pudesse conquistar um lugar ao sol.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Manoel Moraes e Elisena Paim, aos meus grandes irmãos Marcos Fernando e Bruno Paim e a minha companheira Kauany Brandão pela paciência, positividade, confiança e por sempre estarem presentes. As lições e princípios mais importantes são aprendidos em família.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis pela orientação, confiança e apoio para a realização deste trabalho. Obrigado por todas as oportunidades que me proporcionou desde a primeira conversa, pelos bons exemplos em tudo e pelas cobranças justas.

À minha amiga Susy Ricardo Lemes Pontes, pela paciência e tranquilidade em transmitir seus conhecimentos em genética e que me proporcionou um crescimento dentro do meu estudo.

À incansável e competente mestra Janaina Steger pelo incentivo, alegria e entusiasmo.

E a mestranda Maria Alice juntamente com o mestre Dwight Assis pela confiança e préstimo com meu trabalho.

*“Atropelei os sonhos, venci as mágoas, convivi com os
fracos, suportei os falsos, e hoje sei a força que eu tenho
para enfrentar qualquer obstáculo.”*
(VINÍCIUS SIQUEIRA)

RESUMO: A *Tabebuia impetiginosa* é uma importante planta medicinal utilizada no Brasil, conhecida popularmente como Ipê roxo, **nativa** das florestas tropicais chuvosas da América do Sul e Central, e amplamente distribuída no Cerrado brasileiro. Apresenta ação anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e anti-neoplásica. Seu constituinte mais estudado e responsável por atividades farmacológicas é o Lapachol. Baseando-se nas características da solução aquosa do ipê roxo, o objetivo deste estudo foi avaliar sua potencial atividade angiogênica, mutagênica e antimutagênica, mediante os testes da membrana corio-alantoide (MCA) e micronúcleo da medula óssea hematopoiética de camundongos. O quimioterápico mitomicina (MMC), conhecido por seu potencial efeito mutagênico, foi usado como controle positivo. Os resultados da angiogênese evidenciaram um aumento da rede vascular ($p < 0,05$) das MCAs em relação aos controles negativo e inibidor pelo uso da solução aquosa do ipê roxo na concentração de 10 mg/ml. No teste do micronúcleo, observou-se que nas doses de 10, 20 e 30 mg/ p.c., a solução aquosa do ipê roxo não apresentou atividade mutagênica e nem efeito protetor diante da ação genotóxica provocada pela MMC.

Palavras-chave: *Tabebuia impetiginosa*, angiogênese, mutagênica, micronúcleo.

ABSTRACT: Brazil has the world's largest plant genetic diversity, with cataloging more than 55.000 species between an estimated 350-550 thousand, already in equivalence only 8% of the national flora was studied among these plants 1.100 were related to their properties medicinal. Among the many medicinal plants used in Brazil, is *Tabebuia impetiginosa*, popularly known as purple Ipe, typical of the Brazilian cerrado, and has anti-inflammatory, analgesic, antibiotic and anti-neoplastic. The most studied and constituent responsible for pharmacological activities of purple Ipe, as described in the literature is Lapachol. Based on the characteristics of the aqueous solution of purple Ipe, the aim of this study was to evaluate its potential angiogenic, mutagenic and antimutagenic activity by testing the chorioallantoic membrane (MCA) and micronucleus in hematopoietic bone marrow of mice. The chemotherapy mitomycin (MMC), known for its mutagenic effect, was used as positive control. The results showed an increase of angiogenesis in vascular network ($p < 0.05$) compared to the MCAs negative controls ($p < 0.05$) and inhibitor ($p < 0.05$) when using aqueous purple Ipe at a concentration of 10 mg / ml. In the micronucleus test, it was observed that the aqueous solution of purple Ipe at doses of 10, 20 and 30 mg/ b.w., showed no mutagenic activity and no protective effect on the genotoxicity induced by MMC.

Keywords: *Tabebuia impetiginosa*, angiogenesis, mutagenic, micronucleus.

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

a.c	Antes de Cristo
FCFa	Fator de Crescimento Fibroblástico ácido
AMUCC	Associação Brasileira de Portadores de Câncer
AZS	Azida Sódica
FCF β	Fator de Crescimento de Fibroblatos básico
CCNS	Cancer Chemotherapy National Service
EGF	Epidermal Growth Factor
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ip	Intraperitoneal
Kg	Quilograma
MCA	Membrana Corio-alantoide
Mg	miligrama
MI	mililitro
MMC	Mitomicina
MN	Micronúcleo
MNEPC	Eritrócito Policromático Micronucleado
ENC	Eritrócito Normocromático
OMS	Organização Mundial da Saúde
EPC	Eritrócito Policromático
PCDP	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

ERO	Espécies Reativas ao Oxigênio
FC	Fator de Cicatrização
FTC	Fator de Transformação do Crescimento
UV	Ultravioleta
FNT	Fator de Necrose Tumoral
FCEV	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Processo de lesão ao DNA provocado por radiação UV.....6
- Figura 2.** Visão simplificada de alguns passos fundamentais na angiogênese.....11
- Figura 3.** Árvore do Ipê-roxo.....13
- Figura 4.** Detalhe do fruto em forma de vagem do Ipê-roxo.....14
- Figura 5.** Estrutura química do Lapachol.....15
- Figura 6.** Visão da base maior do ovo com fita adesiva transparente lacrando a abertura realizada para exposição da MCA.....20
- Figura 7.** Visão da MCA em ovo embrionado de galinha21
- Figura 8.** Micronúcleo presente em eritrócito policromático.....23
- Figura 9.** Visão da rede vascular formada nas MCAs de ovos embrionados de galinha após tratamento com a solução aquosa de ipê roxo e os controles.....26
- Figura 10.** Comparação entre o percentual médio de vascularização obtido em MCAs tratadas com solução aquosa de ipê roxo e controles.....27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentagem da vascularização da membrana corio-alantoide (MCA), com média e desvio padrão dos controles e do tratamento com a solução aquosa do Ipê Roxo na concentração de 10 mg/ml.....25

Tabela 2. Frequência de MNEPC e relação entre EPC/ENC após 24 horas do tratamento com solução aquosa do ipê roxo e controles28

Tabela 3. Frequência de MNEPC e relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com MMC e solução aquosa do ipê roxo e controles.....29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Propriedades farmacológicas de Plantas.....	3
2.2 Antimutagenicidade de vegetais e Carcinogênese.....	6
2.3 Angiogênese.....	9
2.4 <i>Tabebuia impetiginosa</i>	12
2.4.1. Propriedades farmacológicas do Ipê Roxo.....	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1 Solução aquosa da <i>Tabebuia impetiginosa</i> (Ipê roxo).....	18
4.2 Ovos embrionados.....	18
4.3 Animais utilizados.....	18
4.4 Procedimento experimental para avaliação “ <i>in vivo</i> ” da atividade angiogênica.....	19
4.4.1. Análise histológica.....	21
4.5 Avaliação das atividades mutagênica e antimutagênica pelo teste do micronúcleo.....	22
4.6 Análise de Dados.....	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1 Avaliação da atividade angiogênica na MCA.....	24

5.2 Avaliação da atividade mutagênica.....	24
6. DISCUSSÃO.....	30
6.1 Angiogênese pelo ensaio da MCA.....	30
6.2 Mutagenicidade e Antimutagenicidade pelo teste do micronúcleo.....	31
7. CONCLUSÕES.....	34
8. REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são aquelas de uso popular que tem por objetivo alternativo, o tratamento de doenças ou manutenção da saúde, uma vez que, apresentam princípios ativos que favorecem estes fatores (HOEFFEL *et al.*, 2011).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que aproximadamente 80% da população mundial, de algum modo, utilizam plantas medicinais como medicamentos, e apenas 30% por indicação médica (HALL *et al.*, 2012). No Brasil, há uso popular de plantas medicinais, como nos Estados Unidos, o qual há uma procura por estas plantas com propriedades terapêuticas (LILIENFELD & ARKOWITZ 2013). Tendo em vista uma maior autonomia para o tratamento de determinadas doenças, há indivíduos que procuram os compostos de plantas em fornecedores de lojas naturais (COWAN, 1999).

A quantidade existente de plantas em nosso planeta chega à estimativa de 250 a 500 mil espécies, das quais, 5% são estudadas fitoquimicamente (CECHINEL-FILHO, 1996). O Brasil possui a maior diversidade genética vegetal mundial, com a catalogação com mais de 55 mil espécies entre um total estimado de 350 a 550 mil, já em equivalência apenas 8% dessa flora nacional foi estudada, entre essas plantas 1,100 foram relacionadas com suas propriedades medicinais (HEINZMANN, 2007).

Com a ampliação, de novas técnicas espectroscópicas, vem sendo possível a identificação de mais estruturas moleculares de composições naturais, onde até pouco tempo estas estruturas não eram facilmente identificadas (YUNES, 1998). No entanto, para haver o uso de plantas com fins terapêuticos, é preciso enquadrá-las em modelos aceitáveis de qualidade, segurança, eficácia e propriedades terapêuticas reprodutíveis (FIRMO *et al.*, 2011).

No Brasil, o bioma Cerrado representa o segundo grande domínio ecológico com um total de 220 espécies de plantas estudadas e usadas na

medicina tradicional (OLIVEIRA *et al.*, 2002). A *Tabebuia impetiginosa* conhecida popularmente como Ipê roxo, típica do cerrado brasileiro, já é há anos utilizada na medicina popular para tratamento de diversas doenças, entre elas, o câncer (OLIVEIRA *et al.*, 2002; VON DER PAHLEN, 2002).

Nas décadas de 60 e 70, muitos investimentos foram aplicados em estudos das substâncias extraídas desta planta, como o lapachol o qual possui uma estrutura semelhante à vitamina K e a β -lapachona, chegando a ser comercializado para uso em quimioterapia coadjuvante no tratamento da leucemia (SILVA *et al.*, 2003; MONTENEGRO *et al.*, 2003; CASTELLANOS *et al.*, 2009). Atualmente o Ipê roxo está na lista de espécies ameaçadas de extinção. Um motivo importante é o comércio da casca desta árvore usada para fins terapêuticos (VON DER PAHLEN, 2002).

Diante do exposto, este estudo se objetivou em avaliar os efeitos da solução aquosa da *Tabebuia impetiginosa* (Ipê roxo) em camundongos, observando possíveis atividades angiogênica, mutagênica e antimutagênica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Propriedades farmacológicas de Plantas

O uso de plantas para tratamento e prevenção de doenças tem se tornado mais frequente no mundo. Nos países desenvolvidos, assim como nos naqueles em desenvolvimento, o consumo de produtos de origem natural se eleva gradativamente (VEIGA-JR, 2005). O alto custo dos medicamentos industrializados tem propiciado à busca por terapias alternativas, como uso de plantas medicinais (BRASILEIRO *et al.*, 2008).

Pesquisas mostram que o emprego de plantas usadas para o tratamento de doenças data de uma história de 3000 a. c. (LILIENFELD & ARKOWITZ 2013). Seguindo este viés, o conhecimento do poder medicinal das plantas tem a capacidade de se ligar com a história da humanidade (NOVAIS *et al.*, 2003; COWAN, 1999; CALIXTO, 2000). Há ressaltos que os Neandertais consumiam plantas como a malva com a finalidade terapêutica há 60 mil anos, considerando a ideia, que os poderes de curas são bem antigos (COWAN, 1999). As primeiras descobertas sobre o uso de plantas medicinais estão no Papiro de Ébers o qual foi descoberto e publicado por Georg Ebers. Este material foi pertence à época da XVIII Dinastia, no Egito, e possui relatos de cerca de 100 doenças e um alto número de substâncias de origem animal, vegetal e mineral (VILELA, 1977).

No Brasil, a autor do Tratado Descritivo do Brasil, Gabriel Soares de Souza, realizou em 1957 a primeira descrição sobre o uso de plantas no Brasil para tratamento de doenças. Esse tratado apresentava os produtos medicinais que os índios de “as árvores e ervas da virtude” faziam uso. Após a vinda dos primeiros médicos portugueses para o Brasil, com a escassez de medicamentos Europeus, foi percebida a importância de vegetais utilizados pelos indígenas como medicamento (VEIGA-JR, 2002).

As principais atividades farmacológicas de vegetais já comprovadas cientificamente envolvem ações como: analgesia, atividade antitérmica, anti-inflamatória, antialérgica, antibacteriana, antiparasitária, antifúngica, cicatricial e

antiúlcera (OLIVEIRA *et al.*, 1990; MORAIS *et al.*, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2005; PARENTE *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2010).

Estas atividades estão atribuídas, principalmente, aos princípios ativos presentes nos vegetais. Estes compostos, também denominados Metabólitos secundários, são responsáveis por garantirem a adaptação dos vegetais aos seus ambientes, promovendo uma boa interação entre as plantas e os diferentes ecossistemas (AERTS *et al.*, 1991; HARBORNE, 1988). Os princípios ativos aumentam as chances de sobrevivência de uma espécie, uma vez que são responsáveis por inúmeras atividades biológicas. Nos vegetais, eles atuam como antibióticos, antifúngicos e antivirais protegendo as plantas dos patógenos, além de apresentarem atividades antigerminativas ou tóxicas para outros vegetais. Também, alguns destes compostos formam importantes substâncias que absorvem a luz ultravioleta impedindo que as folhas sofram danos (LI *et al.*, 1993).

Os metabólitos secundários de vegetais são classificados segundo sua rota de biossíntese. As principais famílias de moléculas são consideradas: os compostos fenólicos, terpênicos, e alcaloides (HARBONE, 1999).

Os compostos fenólicos estão envolvidos na síntese de ligninas as quais são atrativos aos seres humanos em virtude do agradável odor, sabor e coloração. Para outros animais, eles também apresentam esta atratividade e facilitam a polinização e dispersão de sementes. Estes compostos atuam como protetores contra raios ultravioletas, insetos, fungos, vírus e bactérias (CROTEAU *et al.*, 2000). Atualmente, mais de 8000 compostos fenólicos já foram detectados em espécies vegetais. Esse complexo grupo se apresenta como pigmentos que dão aspecto colorido aos alimentos, ou como produtos do metabolismo secundário, normalmente oriundos de reações de defesa das plantas contra injúrias do ambiente. Esses compostos apresentam atividade antioxidante, não apenas pela capacidade em doar hidrogênio ou elétrons, como também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que inibem a oxidação de inúmeras biomoléculas do alimento, particularmente de lipídios (BRANDWILLIAMS *et al.*, 1995).

Os Terpenos (ou terpenóides) representam o grupo mais antigo de produtos de moléculas sintetizados por vegetais e o mais amplos de produtos naturais. Estes compostos são hidrocarbonetos com múltiplas unidades de uma estrutura básica, o isopreno. Sua fórmula geral é $(C_5H_8)_n$ (BERNTHSEN, 1981). Mono e sesquiterpenos, por exemplo, são os principais constituintes de óleos essenciais, enquanto outros terpenos compõem bálsamos, resinas, ceras e borrachas (MOHAN *et al.*, 2006). Os terpenos apresentam inúmeras funções nos vegetais. Monoterpenos atuam na atração de polinizadores, enquanto os sesquiterpenos protegem os vegetais contra fungos e bactérias. Os diterpenos originam hormônios de crescimento vegetal (MORITA *et al.*, 2000; HOLETZ *et al.*, 2002)

Os alcaloides são designados como compostos farmacologicamente ativos, por apresentarem um nitrogênio e se derivarem de aminoácidos (Cordell, 1981). Porém, estes compostos não estão distribuídos uniformemente no reino vegetal e estão restritos para alguns gêneros e espécies de plantas. Esta distribuição limitada de compostos secundários forma a base da quimiotaxonomia e ecologia química (HARBORNE, 1988). A atividade dos alcaloides nas defesas químicas dos vegetais é sustentada pelos inúmeros efeitos fisiológicos que são exercidos sobre os animais e também pelas atividades antimicrobianas. Diversos alcaloides apresentam toxicidade aos insetos e agem como repelente para herbívoros (CROTEAU *et al.*, 2000; FUMAGALI *et al.*, 2008).

Mesmo diante da comprovação científica sobre as propriedades farmacológicas de inúmeros vegetais, a maior parte das plantas comercializadas para fins terapêuticos não apresentam evidências científicas (BOCHNER *et al.*, 2012). No Brasil, importantes exemplos são a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), abajerú (*Chrysobalanus icaco*), boldo (*Peumus boldus*), erva-de-bicho (*Polygonum punctatum*) e arnica (*Arnica montana*) (RUSCHEL & NODARI, 2008; SILVA & PEIXOTO, 2009; BOCHNER *et al.*, 2012).

A toxicidade de plantas medicinais constitui um importante problema de saúde pública. Os efeitos adversos de medicamentos naturais, possíveis

adulterações e toxicidade, assim como a interação com outros medicamentos, são comuns (VEIGA-JR *et al.*, 2005).

2.2. Antimutagenicidade de vegetais e Carcinogênese

O processo de mutagenicidade ocorre quando as células ficam expostas a um agente mutagênico provocando em seguida, danos ao material genético o qual não sofre reparo durante o processo de replicação celular (Figura 1) (MOREIRA *et al.*, 2002; MONTAGNER & COSTA, 2009). Muitos compostos mutagênicos e carcinogênicos podem ter relação na formação de espécies reativas ao oxigênio (ERO) as quais possuem importante papel em processos degenerativos, lesões do DNA, mutações relacionadas ou não ao câncer, problemas cardíacos e envelhecimento (ANDERSON *et al.*, 1995; MOHAN & MELTZ, 1994; AMES, 1983; HALLIWELL & GUTTERRIDGE, 1989).

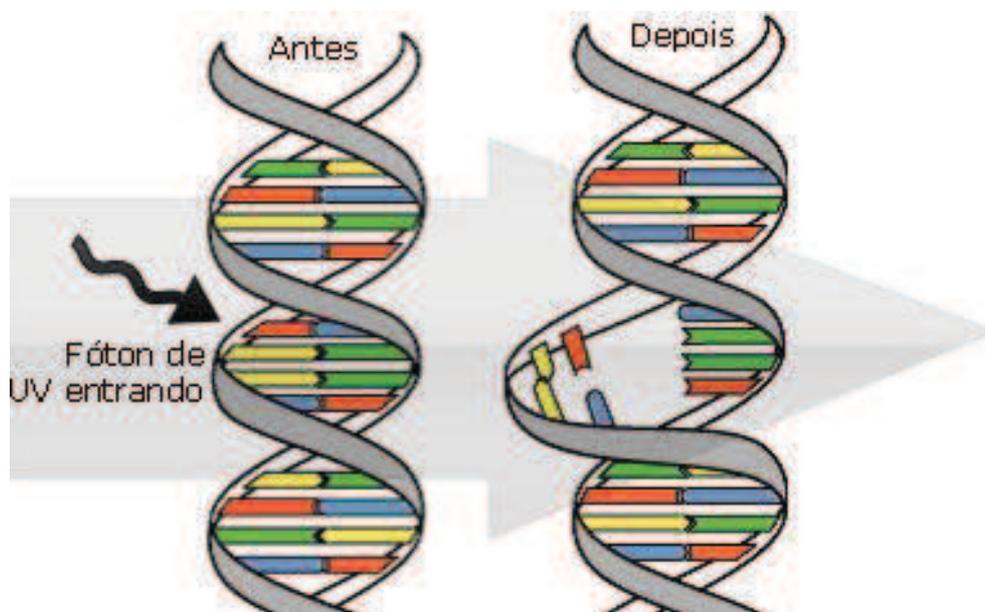


Figura 1. Processo de lesão ao DNA provocado por radiação UV
Fonte: MONTAGNER & COSTA (2009).

Os agentes mutagênicos podem ser classificados em físicos e químicos. Os agentes físicos mutagênicos compreendem: Raios X, raios gama (radiação ionizante) e ultravioleta (UV). Já os químicos mutagênicos podem envolver substâncias como: bromouracila, acridina, brometo de etídeo, benzopireno, dentre outros (HIGA, 2007). Em elemento mutagênico pode muitas vezes promover uma carcinogênese.

Na carcinogênese o processo em geral ocorre lentamente, podendo levar anos para que uma célula cancerosa se prolifere e origine um tumor visível. Esse processo por alguns estágios até alcançar a forma de tumor. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Inicialmente ocorre o estágio de iniciação onde a célula sofre o efeito de mutagênicos ou carcinógenos que provocam alterações em seus genes. Nesta fase as células estão geneticamente alteradas, mas não é possível detectar um tumor clinicamente. Encontram-se "iniciadas" para a fase de promoção da carcinogênese (HIGA, 2007; AMUCC, 2011).

Aqui, as células "iniciadas", sofrem o efeito dos agentes cancerígenos oncopromotores. Tal célula é transformada em maligna, de forma lenta e gradual. Para tanto, é necessário um longo e contínuo contato com o agente cancerígeno promotor. A inibição do contato com agentes promotores nesse estágio muitas vezes interrompe o processo (HIGA, 2007). Por fim, inicia-se o estágio da progressão o qual se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Aqui o câncer já está instalado, e evoluindo até o aparecimento das primeiras manifestações clínicas da doença (AMUCC, 2011).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) a cada ano mais de 12,7 milhões de pessoas no mundo são diagnosticadas com câncer e 7,6 milhões morrem. No Brasil, apenas em 2013 foram registrados quase 500 mil novos casos da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Estima-se que ocorrerão 26 milhões de casos novos e 17 milhões de mortes por ano em 2030. E a maior parte dos casos novos será nos países em desenvolvimento. O custo do câncer no mundo para a economia global em mortes prematuras e invalidez,

desconsiderando os custos médicos, foi estimado em US\$ 1 trilhão (GASPERIN *et al.*, 2011).

Conforme a Associação Brasileira de Portadores de Câncer (AMUCC), o câncer de pele é o mais frequente e corresponde a 25% de todos os tumores malignos registrados. Possui grandes chances de cura, se for detectado precocemente. O câncer de pulmão, o mais comum dentre os tumores malignos, é altamente letal, com sobrevida média entre 7 e 10% nos países em desenvolvimento. É seguido pelos cânceres colorretal e de próstata (AMUCC, 2011).

As iniciativas mais importantes na batalha contra o câncer são o melhoramento do diagnóstico (detecção precoce permitindo controle da doença), novos meios de tratamento (procedimentos menos agressivos que atuem apenas nas células malignas) e medidas preventivas aplicáveis à população (DOUGLAS, 2000).

Diante do grande número de casos novos que surgem a cada ano, há um enorme interesse pelo estudo do câncer através de estudos que envolvem desde fatores ambientais, como dieta e hábitos de vida, os quais podem ter relação ao desenvolvimento da doença, até lesões consideradas pré malignas (KEIGHLEY & WILLIAMS, 1998). Também, inúmeros tratamentos experimentais têm sido testados, dentre eles está o estudo de plantas típicas de várias regiões (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Atualmente, muitos estudos tem dado ênfase nas substâncias provenientes de plantas que apresentam propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas (BESSA, 2010). Muitos compostos vegetais apresentam propriedades antimutagênicas como os beta carotenos (Vitamina A), ácido ascórbico (Vitamina C), o tocoferol (Vitamina E), polifenóis, compostos sulfídricos, cálcio, fibras, etc. (HIRAMATSU *et al.*, 2004; GOODMAN & GILMAN, 2003; AMES, 1983).

Estudos, por exemplo, com o extrato da *Aloe vera* (babosa) verificam o potencial efeito antimutagênico por meio da redução da atividade mutagênica de substâncias como a Aflatoxina B, Benzo[a]pireno, Peróxido de Hidrogênio,

Azida Sódica (AZS) e Mitomicina C (MMC), (LIRA, 2007). Também, outros compostos antígenotóxico, presentes em alimentos, têm função antioxidante e atuam sequestrando os radicais livres de oxigênio (KHAN, 2005; ANGELIS, 2001; MOHAN & MELTZ, 1994).

2.3. Angiogênese

O processo de angiogênese constitui na formação de novos vasos sanguíneos a partir de capilares pré-existentes. Ressalta-se que a Vasculogênese envolve a formação primária de vasos sanguíneos a partir de precursores da célula endotelial (angioblastos), durante a fase embrionária (RISAU *et al.*, 1997; PAPETTI & HERMAN, 2002; GONZÁLEZ *et al.*, 2002).

A angiogênese ocorre durante o desenvolvimento embrionário e é observada ao longo da vida adulta em eventos fisiológicos como a ovulação, ciclo endometrial, desenvolvimento da placenta e reparação de feridas (PEPPER, 2001).

O controle da angiogênese feito por um fino balanço entre fatores endógenos promotores e inibidores (FOLKMAN & SHING, 1992). Diversos peptídeos purificados apresentam relação na angiogênese. Dentre eles está o fator de crescimento fibroblástico ácido (FCFa), fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb), a angiogenina, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PCDP), o fator induzido por hipóxia (Hypoxia-Inducible factor - HIF1), o fator de transformação do crescimento α e β (FTC- α e FTC- β), fator de necrose tumoral α (FNC- α), fator de crescimento epidérmico (Epidermal Growth Factor - EGF), interleucinas 1 e 2 (IL-1, IL-2), fator de cicatrização/fator de crescimento epidérmico (FC/EGF) e o fator de crescimento endotelial vascular (FCEV) (VALIATTI *et al.*, 2011; KARAMYSHEVA, 2007; KALKA *et al.*, 2000), dos quais o FCEV é o mais investigado.

In vitro, o FCEV contribui no crescimento celular endotelial a partir de artérias, veias e vasos linfáticos e inibe a apoptose endotelial provocada por

ausência de nutrientes. Em testes experimentais, a inibição de FCEV promove alterações de apoptose na vascularização neonatal, mas não em adultos (KASAHARA *et al.*, 2000; LEE & HICLIN, 2008). O FCEV apresenta três receptores: FCEVR-1, FCEVR-2 e FCEVR-3. As proteínas transmembrânicas VEGFR-1 (Flt-1) e VEGFR-2 (Flt-2) são receptores de alta afinidade de FCEV com domínio tirosina-quinase (CAPP *et al.*, 2009).

Estudos apontam que o processo de angiogênese é fundamental para o desenvolvimento de tumores. Uma vez que o tumor se segue em desenvolvimento, a entrega de nutrientes à base através de fonte sanguínea para as células tumorais é fundamental para seu crescimento (FERRARA *et al.*, 1998; HANAHAN & FOLKMAN, 1996). Deste modo, a produção de fatores angiogênicos em células cancerosas é promove o desenvolvimento de tumores sólidos (FOLKMAN, 1990).

Quando a sinalização de FCEV é inibida, a angiogênese tumoral e, conseqüentemente, o crescimento do tumor é prejudicado (KIM *et al.*, 1993; MILLAUER *et al.*, 1994). Na angiogênese tumoral (Figura 2), o FCEV promove o desenvolvimento de tumores em virtude de seu potencial de conduzir a permeabilização dos vasos sanguíneos e induzir a formação de infiltrados em vasos sanguíneos. Em diferentes tipos de tumores, é frequente a detecção de altos níveis na produção de FCEV em células tumorais (ESSER *et al.*, 1998; ROBERTS & PALADE, 1997).

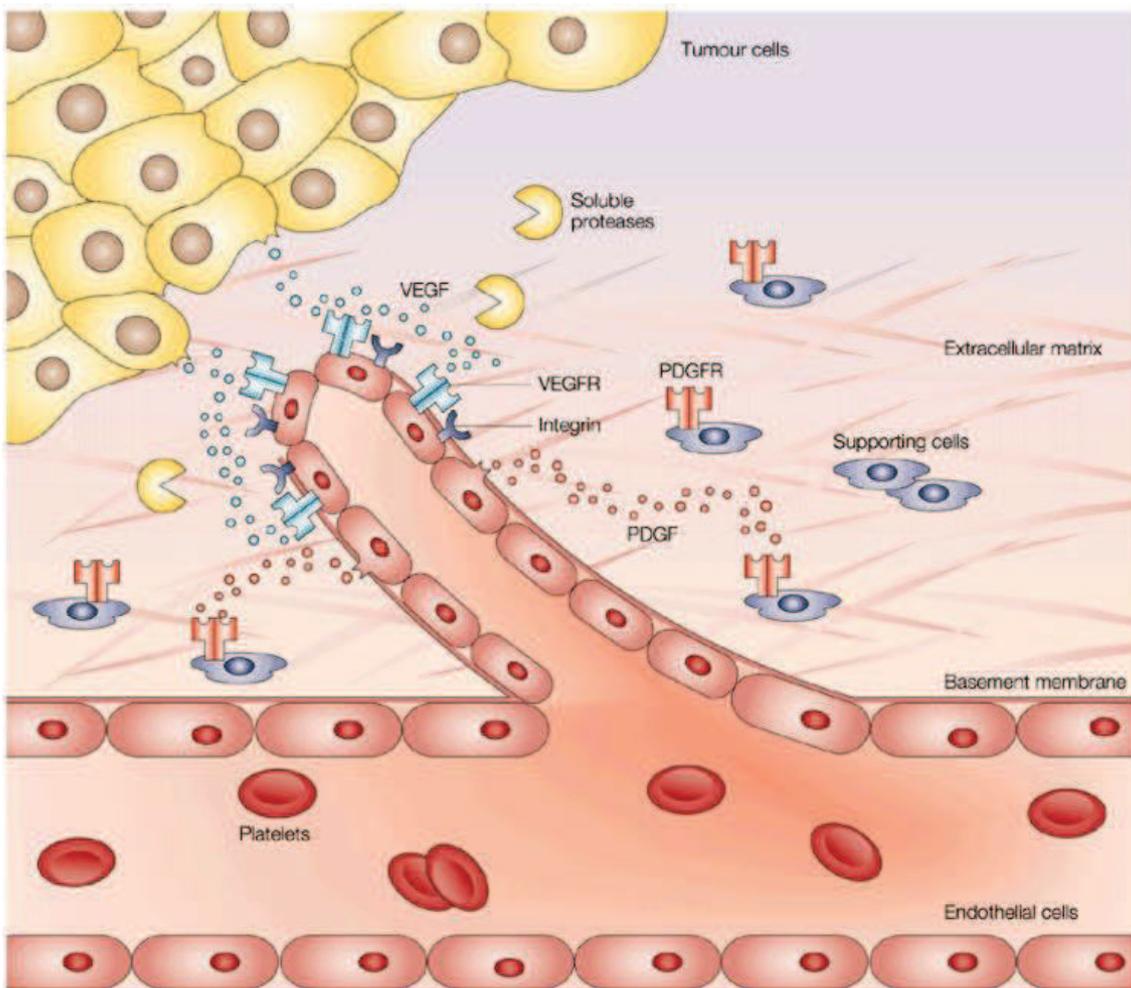


Figura 2. Visão simplificada de alguns passos fundamentais na angiogênese tumoral.

Fonte: Cristofanilli *et al* (2002).

Considerando a participação do processo angiogênico na formação de tumores, pesquisas voltadas para a produção de medicamentos inibidores da angiogênese estão em desenvolvimento e muitos fármacos com esta atividade já são aprovados em 28 países (FOLKMAN, 2006).

Cerca de 60 e 75% dos fármacos usados no tratamento do câncer e doenças infecciosas, são derivados de fontes naturais (NEWMAN *et al.*, 2003). Estudos apontam que três glicosídeos flavonóides: rutina (quercetina 3-O-rutinosídeo), campferol (3-O-robinobiosídeo) e campferol (3-O-rutinosídeo), isolados das folhas de *Melia azedarach* apresentam efeito anti-angiogênico em ensaio *in vivo* utilizando a membrana corio-alantoide (MCA) de embriões de galinha (KUMAZAWA *et al.*, 2013).

Os extratos de *Bidens pilosa* e *Casearia sylvestris* possuem capacidade de inibir o crescimento tumoral em camundongos, reduzindo significativamente o percentual de vasos sanguíneos em torno de tumores (BUCKER, 2012). O extrato das folhas de *Punica granatum* reduz, *in vitro*, o número de células do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE) na cavidade peritoneal de camundongos, além de reduzir o padrão de vascularização da parede abdominal (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Testes com o extrato de diclorometano da casca de *Garcinia amplexicaulis* demonstram que a presença de tocotrienóis, triterpenos e xantonas neste vegetal inibem, *in vitro*, a angiogênese de células endoteliais induzida por VEGF e a adesão e migração das mesmas (LAVAUD *et al.*, 2013).

Os estudos relacionados a avaliação do potencial efeito anticâncer de plantas em linhagens de células humanas têm permitido o avanço de pesquisas atuais, orientando a seleção de outros modelos e estudos de mecanismos de ação (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010).

2.4 *Tabebuia impetiginosa*

A *Tabebuia impetiginosa* (Figura 3), popularmente conhecida por ipê-roxo, pau d'arco-roxo, e ipê-roxo-de-bola, é uma espécie vegetal pertencente a família Bignoniaceae. Apresenta porte arbóreo, atingindo alturas de 8 a 35 metros, com característica de planta caducifolia (LORENZI, 2002).

Ocorre em quase todo o território brasileiro, além de países como Paraguai e Argentina (REITZ *et al.*, 1988; CARVALHO, 1994). Está presente tanto na floresta pluvial atlântica como na semidecídua (LORENZI, 2002). É comum na vegetação secundária, abrangendo capoeiras e capoeirões (LONGHI, 1995).



Figura 3: Árvore do Ipê-roxo.
Fonte: GUANANDI (2008).

O tronco é reto, cilíndrico e, por vezes, tortuoso, apresentando de 30 a 40 cm de diâmetro. Sua casca externa é grisácea, levemente áspera, com sulcos longitudinais pouco profundos e fissuras horizontais curtas e irregulares, desprendendo-se em escamas retangulares e grossas. A casca interna é fibrosa, com tonalidade marrom-clara e levemente rosada. As folhas são opostas digitadas, apresentando pecíolo de até 11 cm de comprimento, com cinco folíolos, com margem inteira ou levemente serrada (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

Os folíolos apresentam mechas de pêlos na axila da nervura principal com as secundárias. As flores são de rosadas a lilás, tubulares, vistosas, unidas em panícula terminal. O ipê-roxo floresce no período de maio a setembro e frutifica entre julho e novembro. Na floração, a queda das pétalas é seguida pela queda das folhas. Após cerca de 10 dias ocorre a frutificação. Contudo, este evento não ocorre todos os anos; existindo variações na floração e na frutificação onde, às vezes, a árvore deixa de florescer por 1 ou 2 anos seguidos (SHANLEY *et al.*, 2010).

O fruto (Figura 4) é silíquo cilíndrico estreito, deiscente, com numerosas sementes. Suas sementes são codiformes, tendendo à oblonga plana, apresentam superfície lisa lustrosa de cor marrom-clara, e presença de asa membranácea nas duas extremidades de cor marrom clara transparente de até 3 cm de comprimento, sendo sua dispersão anemocórica (REITZ *et al.*, 1988; CARVALHO, 1994).

A semente é a forma pela qual a planta sobrevive por mais tempo e com mínimo de atividade fisiológica. Segundo Harrington (1972), o teor de água das sementes durante a conservação é um dos fatores de maior influência na longevidade. Deste modo, o período de viabilidade de sementes é decorrente do teor de água presente na semente e da temperatura do armazenamento (BEWLEY & BLACK, 1984).

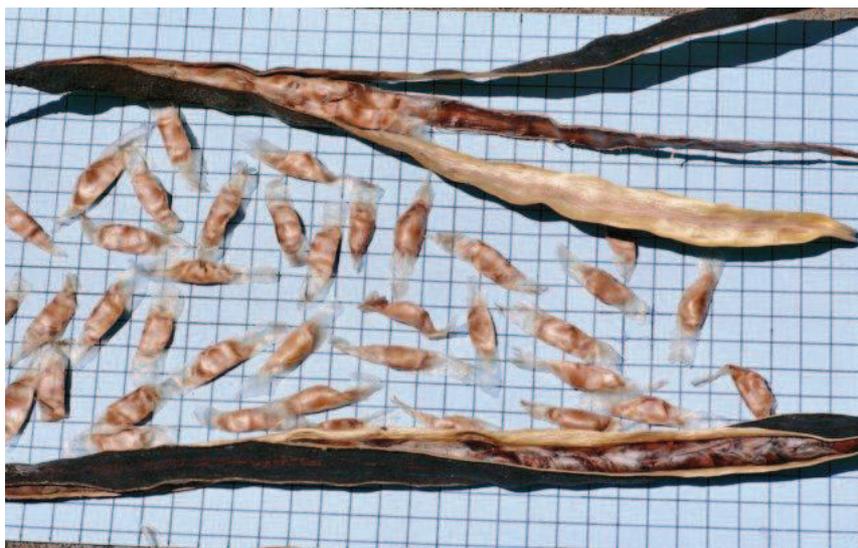


Figura 4. Detalhe do fruto em forma de vagem do Ipê-roxo aberto e com sementes.

Fonte: Foto retirada no Balão do Mondubim (2008).

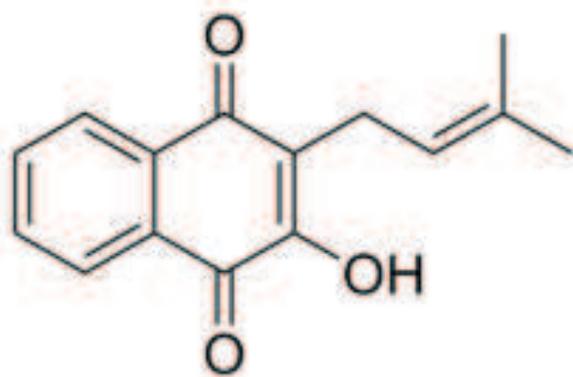
Uma característica silvicultural do Ipê roxo é a ocorrência de heliófila, contudo tolera sombreamento moderado na fase jovem, podendo ser plantada a plena insolação, principalmente em solos férteis com plantios mistos associada às espécies pioneiras, e em enriquecimento de capoeiras ou capoeirões quando plantada em linhas ou faixas. Além disso, apresenta desrama natural favorável, quando plantada em adensamento, porém na

maioria dos casos precisa de poda, apresentando uma boa cicatrização (SCHNEIDER *et al.*, 2000).

A espécie possui alto valor econômico, ornamental e medicinal (ETTORI *et al.*, 1996). Apresenta risco de extinção, estando catalogada na relação das espécies para conservação genética *ex situ* no Instituto Florestal de São Paulo (SIQUEIRA & NOGUEIRA, 1992).

2.4.1. Propriedades farmacológicas do Ipê Roxo

O constituinte mais estudado e responsável por atividades farmacológicas do ipê roxo, já descritas na literatura, é o Lapachol (Figura 5). Esta substância é um produto natural, quimicamente identificado como uma naftoquinona, isolada de diversas espécies vegetais da família Bignoniaceae. Suas atividades incluem: ação anti-inflamatória, analgésica, antibiótica e anti-neoplásica (ARAÚJO *et al.*, 2002).



Lapachol

Figura 5. Estrutura química do Lapachol
Fonte: Araujo *et al* (2002).

Os detalhes químico-estruturais das naftoquinonas estão relacionados com a potência de atividades (antimicrobiana, antineoplásica ou de toxicidade),

sendo inativado apenas pela retirada de um metileno da cadeia isoprenóide (LAGROTTA *et al.*, 1987). Este fato explica as observações de que o lapachol isolado é menos ativo que a solução aquosa do bruto do Ipê, o que sugere uma sincronia de ações a outros compostos, e depois que seu derivado (β -Lapachona), algumas vezes, possui uma maior atividade farmacológica, contudo com maior grau de toxicidade (GUIRAUD *et al.*, 1994).

São poucos os estudos sobre extrato de plantas, como o lapachol, que foram realizados em seres humanos. Um deles, não controlado e patrocinado pelo INCA no início de 1970, não encontrou efeitos tóxicos da substância sobre o fígado ou tecido renal. No entanto, o lapachol permitiu a prevenção e a coagulação do sangue, e altas doses afetaram tumores o que representava um sério risco de hemorragia. Mas a função de coagulação, nestes casos, voltou ao normal depois que a droga foi interrompida (WOO, 2006).

Outros testes não confirmados mostraram que a casca do Ipê roxo estimulou as células do sistema imunológico, macrófagos, a agirem. A substância também eliminou células de câncer de pulmão e de fígado cultivadas em tubos de ensaio e reduziu a taxa de propagação de câncer de pulmão em ratos após cirurgia para remoção de tumor canceroso (AMERICAN CANCER SOCIETY, 1993). Além disso, com a síntese de substâncias químicas tóxicas e genotóxicas, o extrato desta planta possui defesas contra ataques de bactérias, fungos, insetos e animais predadores (CASTRO, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da solução aquosa da *Tabebuia impetiginosa* (Ipê roxo) em relação às possíveis atividades angiogênica e mutagênica.

3.2 Objetivos específicos

- Detectar a possível atividade angiogênica da solução aquosa do ipê roxo mediante realização de testes laboratoriais “*in vivo*”, utilizando como modelo experimental a membrana corio-alantoide do ovo embrionado de galinha.
- Detectar a possível presença da atividade mutagênica da solução aquosa do ipê roxo mediante realização de experimentos “*in vivo*”, utilizando como modelo experimental o teste de micronúcleo em camundongos.
- Detectar a possível presença da atividade antimutagênica da solução aquosa do ipê roxo mediante realização de experimentos “*in vivo*”, pelo tratamento simultâneo da solução aquosa da planta e de composto sabidamente genotóxico Mitomicina C (MMC), utilizando-se o teste de micronúcleo em camundongos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Solução aquosa da *Tabebuia impetiginosa* (Ipê roxo)

A casca do ipê roxo foi adquirida no mercado central de Goiânia, CNPJ 15.610.962/0001-30, apresentando data de validade até junho de 2015.

Foi utilizada uma balança de precisão para pesar 10, 20 e 30 gramas da casca. Posteriormente, para obtenção de três diferentes doses da solução aquosa do ipê roxo, foi adicionado 1 litro de água destilada em balão volumétrico junto a 10, 20 e 30 gramas da casca da planta. Deste modo, foi realizado o processo de infusão (chá) em temperatura de 100 C° durante 10 minutos, seguido de repouso por 10 minutos. Ressalta-se que na avaliação da atividade angiogênica, foi utilizada apenas a infusão obtida com 10 gramas da casca do ipê roxo.

4.2 Ovos embrionados

Foram analisadas 60 amostras de membrana corio-alantoide (MCA) de ovos férteis de galinha da espécie *Gallus domesticus*, linhagem Rhoss, distribuídas em 15 amostras para o controle positivo, 15 para o negativo, 15 para o inibidor e 15 para a substância teste. Os ovos foram adquiridos junto à granja Rio Branco Alimentos. O ensaio da MCA não necessitou passar pelo comitê e ética no uso de animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC – GO).

4.3 Animais utilizados

Para os testes de mutagenicidade e antimutagenicidade foram utilizados 40 camundongos machos, saudáveis, da espécie *Mus musculus* "out bread"

linhagem Swiss Webster, oriundo do Biotério da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, apresentando peso corpóreo entre 30 e 40 gramas e faixa etária entre 45 e 60 dias no dia do experimento. Trinta animais foram utilizados para os testes de mutagenicidade e de antimutagenicidade, 5 para o controle negativo e 5 para o controle positivo.

4.4 Procedimento experimental para avaliação “*in vivo*” da atividade angiogênica

Os ovos embrionados de galinha foram incubados em estufa automática a temperatura de 38°C, com umidade a 65% e deslocados lateralmente a cada 15 minutos, durante os cinco primeiros dias de incubação. No quinto dia de incubação foi realizada, na casca do ovo, uma abertura circular (1,0 cm de diâmetro) em sua base maior (onde está localizada a câmara de ar) com auxílio de uma micro-retífica Dremel (RIBATTI *et al*, 1996). O procedimento ocorreu dentro de uma câmara de fluxo laminar, em ambiente previamente esterilizado com luz ultravioleta.

Após a abertura na casca do ovo, com o uso de uma seringa estéril, foi depositada uma gota (NaCl 0,9%) sobre a membrana da casca afim de auxiliar sua retirada e expor a MCA já vascularizada. A abertura, então, foi lacrada com fita adesiva transparente (Figura 6) e os ovos retornaram à incubadora, porém, sem agitação periódica e com a base maior voltada para cima.



Figura 6. Visão da base maior do ovo com fita adesiva transparente lacrando a abertura realizada para exposição da MCA.

No 13° dia de incubação, discos de papel de filtro com 0,5 cm de diâmetro, veiculando 3 μ L/filtro da solução aquosa do ipê roxo e com os controles negativo (água destilada), inibidor (solução de dexametasona) e positivo (Regederm®) foram colocados diretamente sobre vasos da MCA. Todos os ovos voltaram para a incubação onde permaneceram até o 16° dia (RIBATTI *et al.*, 1996).

Posteriormente, todas as MCAs foram fixadas com solução de formol (10 %) por 5 minutos, cortadas com auxílio de tesoura cirúrgica fina, retiradas e mantidas em placa de Petri com solução de formol. Após isso, foram obtidas, por equipamento digital as imagens da MCAs sobre fundo azul claro, em tamanho 640x480 pixels e formato de RGB 24 bites, padronizados para posterior análise e quantificação da rede vascular pelo programa Image J (WILTINGET *et al.*, 1995).

4.4.1. Análise histológica

A MCA do ovo de galinha com a rede vascular neoformada foi incluída em bloco de parafina. Posteriormente, foram preparados cortes histológicos e corados com solução de hematoxilina-eosina, segundo técnica clássica padronizada.

O material foi observado em microscópio de luz comum em aumento de 40x e as imagens das MCAs foram fotografadas por uma câmara digital (Sony Cyber-shot 6.0 mega pixels), em condições padronizadas, e a rede vascular da MCA foi quantificada por meio do processamento da imagem pelos programas de domínio público Gimp for Windows (versão 2.0.5) e Image J (versão 1.28) para visualização dos vasos sanguíneos.

No ensaio da MCA, a rede vascular da membrana (Figura 7) do embrião de galinha é utilizada como uma região sensível a estímulos angiogênicos e antiangiogênicos (RIBATTI *et al.*, 1996).

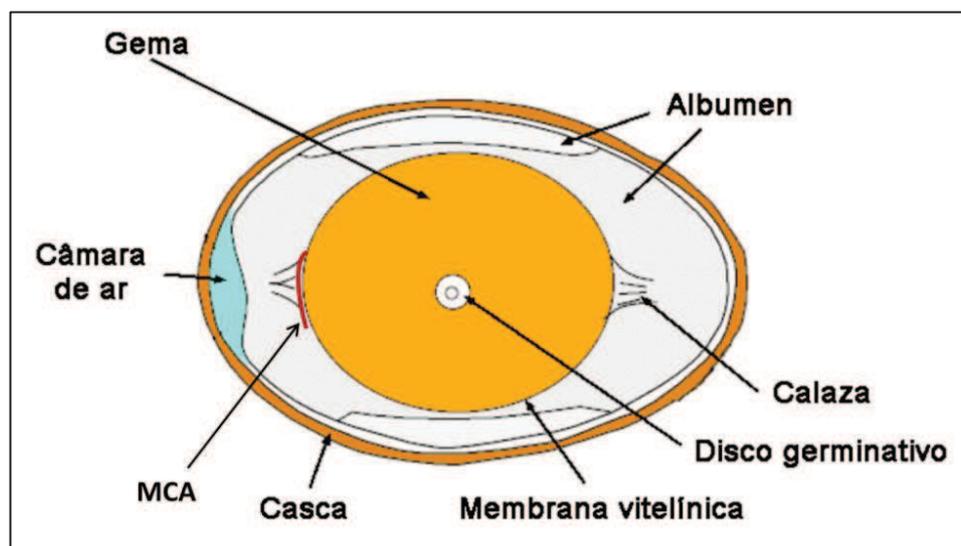


Figura 7. Visão da MCA em ovo embrionado de galinha
Fonte: Adaptado de NUNES (2010).

4.5 Avaliação das atividades mutagênica e antimutagênica pelo teste do micronúcleo

O método utilizado para o teste do micronúcleo seguiu em conformidade com o protocolo experimental de HEDDLE (1973) e SCHMID (1975). Na avaliação da mutagenicidade, os camundongos foram divididos em 5 grupos de cinco animais cada. Foram tratados, intraperitoneal (ip), com as doses de 10, 20 e 30 mg/kg por peso corpóreo (p. c.) da solução aquosa do ipê roxo. O grupo controle negativo foi tratado com água destilada estéril, enquanto que o grupo controle positivo recebeu dose única, via ip, de 4 mg/kg correspondendo a 80% da DL₅₀ de mitomicina C (MMC).

Para a avaliação da antimutagenicidade, foi administrada as doses de 10, 20 e 30 mg/kg da solução aquosa do ipê roxo concomitantemente com uma dose de 4 mg/kg de MMC. Decorrido um período de 24 horas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Os fêmures foram removidos e sua epífise proximal foi seccionada para aspiração da medula óssea hematopoiética com uso de soro bovino fetal. Após a homogeneização da medula no soro, o material foi centrifugado a 300 x g por cinco minutos. O sobrenadante foi descartado e a preparação de lâminas foi realizada com o precipitado. Após a secagem das lâminas, estas foram coradas em soluções de Giemsa tamponada e depois foram analisadas avaliando-se 1000 EPC e computados concomitante à frequência dos ENC em duas lâminas para cada animal e sendo estas examinadas em objetivas de imersão (RIBEIRO, 2003).

O teste do micronúcleo (MN) é o ensaio, *in vivo*, mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal), sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Este teste foi desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos (SCHMID, 1971). A presença de MN (Figura 8) é analisada em eritrócitos policromáticos (EPC) de medula óssea de camundongos, mas

pode, também, ser analisada em eritrócitos normocromáticos (ENC), (HEDDLE, 1973).

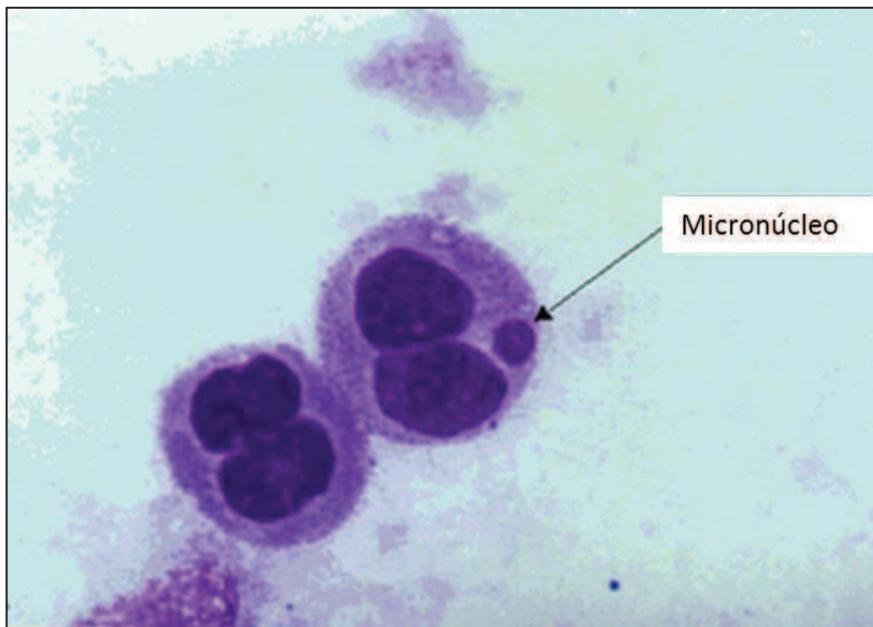


Figura 8. Micronúcleo presente em eritrócito policromático
Fonte: Adaptado de CORRÊA *et al* (2009).

4.6 Análise de Dados

Para analisar as atividades mutagênicas e antimutagênica da solução aquosa do ipê roxo foi realizada a comparação das frequências dos resultados obtidos dos grupos tratados com os grupos de controle positivos pelo teste de análise de variância (ANOVA). Esses resultados também foram comparados ao grupo de controle negativo pelo mesmo teste.

O valor de P foi considerado significativo quando menor que 0,05 ($p < 0.05$). Para avaliação de efeito citotóxico, foi considerada a relação de EPC/ENC da solução aquosa do ipê roxo em diferentes concentrações e comparado aos controles positivos pelo teste ANOVA.

Na análise da atividade angiogênica da solução aquosa do ipê roxo, utilizou-se o teste análise de variância (ANOVA). Os valores de $p < 0,05$ foram estatisticamente considerados significativos nos grupos comparados.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade angiogênica na MCA

Os resultados obtidos a partir da análise da rede vascular neoformada nas MCAs tratadas com as substâncias teste e controle, foram analisados pelo método de cálculo das áreas percentuais e comparação das redes vasculares dos controles e do teste.

Na tabela 1 verifica-se que o percentual médio da rede vascular de amostras de MCA tratadas com o controle positivo, foi de 49,9% e as membranas tratadas com o ipê roxo (10 mg/ml), apresentaram média de 45,5%. Estes dados demonstram que o ipê roxo promoveu um aumento na área vascular das MCAs, no entanto, o aumento obtido não apresenta diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparado o controle positivo.

Por outro lado, é verificado que a vascularização média obtida em amostras tratadas com ipê roxo apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao percentual obtido em membranas dos controles neutro (31,4%) e inibidor (11,7%). Quando comparados os controles positivo e neutro, foi detectada diferença estatística significativa ($p < 0,05$). Também, as MCAs tratadas com o controle inibidor apresentaram significativa redução da vascularização ($p < 0,05$) em relação aos controles neutro e positivo.

Tabela 1. Percentagem da vascularização da membrana corio-alantoide (MCA), com média e desvio padrão dos controles e do tratamento com a solução aquosa do Ipê Roxo na concentração de 10 mg/ml.

Nº	Controle positivo (Regederm)	Controle Neutro (H ₂ O)	Controle negativo (Dexametazona)	Teste (Ipê Roxo 10 mg/ml)
1	51,2	30,1	10,1	44,4
2	48,7	34,6	15,3	48,6
3	56,3	33,6	14,8	39,9
4	48,4	38,5	15,8	40,1
5	52,9	25,8	12,4	52,5
6	53,7	33,1	11,9	41,2
7	44,9	28,7	10,8	47,3
8	43,4	26,5	9,5	48,6
9	50,7	29,9	10,5	40,8
10	55,2	31,3	12,9	46,5
11	51,7	31,2	9,2	48,1
12	49,2	29,3	10,4	52,5
13	45,4	33,4	11,3	42,7
14	45,8	32,8	9,5	49,4
15	50,6	31,6	10,6	40,3
Média	49,9	31,4	11,7	45,5
D. Padrão	3,8	3,2	2,2	4,5

Na Figura 9, é possível observar a rede vascular dos controles e teste. A solução aquosa do ipê roxo, concentração de 10 mg/ml, apresentou um aumento significativo na neoformação vascular, indicando atividade angiogênica.

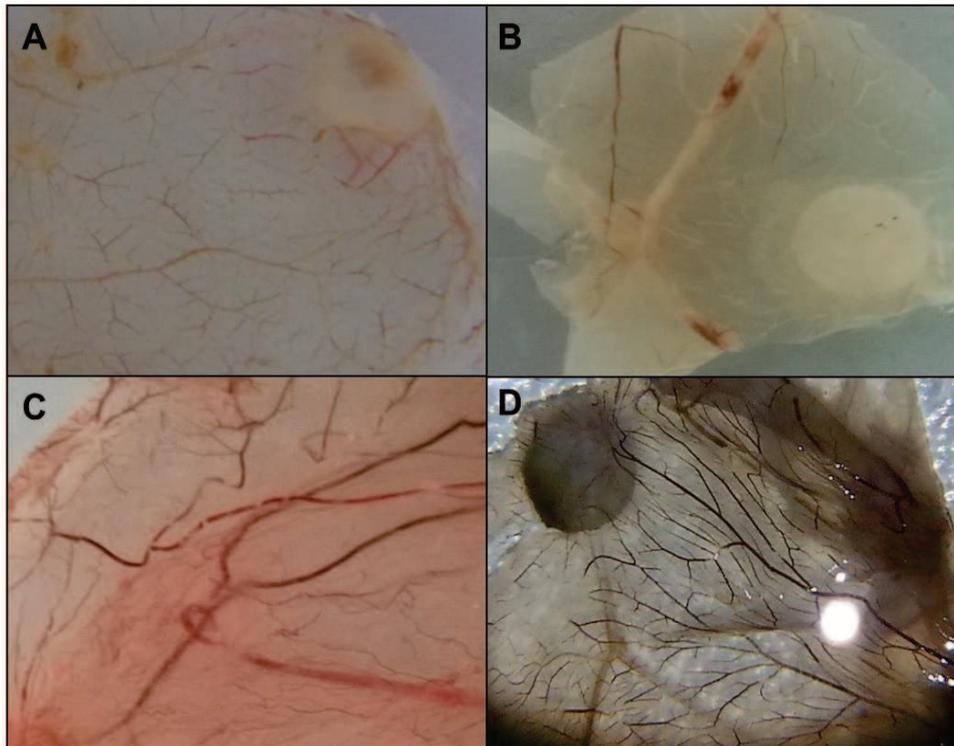


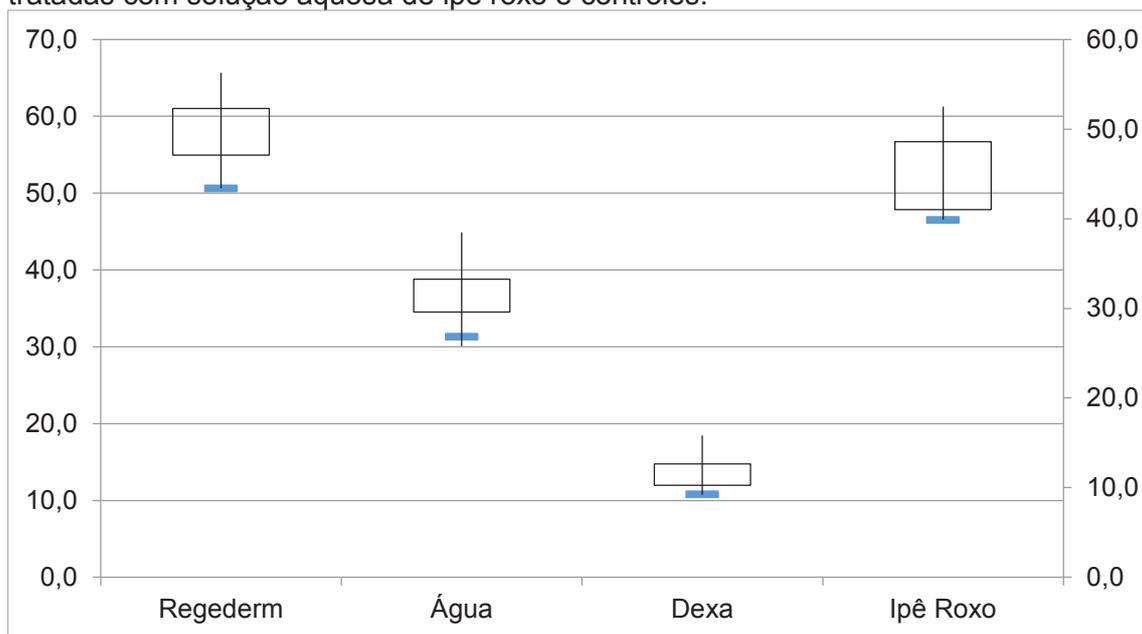
Figura 9. Visão da rede vascular formada nas MCAs de ovos embrionados de galinha após tratamento com a solução aquosa de ipê roxo e os controles.

A – Controle neutro; B - Controle inibidor; C – Controle indutor; D – Teste (solução aquosa do ipê roxo).

Os dados apresentados na Figura 10 evidenciam as diferenças significativas detectadas na comparação entre o percentual médio de vascularização, obtido em MCAs tratadas com a solução aquosa do ipê roxo e os controles positivo, neutro e inibidor.

A média percentual de vascularização, observada nas MCAs tratadas com o controle positivo, foi superior a 40%. Em amostras que receberam o controle neutro, o valor inferior a 40%. Com o uso do controle inibidor, o percentual médio foi menor que 20%, e com a solução aquosa do ipê roxo, o valor médio da vascularização obtida nas amostras também foi superior a 40%.

Figura 10. Comparação entre o percentual médio de vascularização obtido em MCAs tratadas com solução aquosa de ipê roxo e controles.



Deste modo, verificou-se que o ipê roxo apresentou um aumento significativo na formação da rede vascular de MCAs, evidenciado assim, que esta substância apresenta atividade angiogênica.

5.2 Avaliação da atividade mutagênica

Na avaliação da atividade mutagênica da solução aquosa do ipê roxo, utilizou-se o teste de micronúcleo na medula óssea hematopoiética de camundongos. Os resultados da frequência de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (MNEPC), média, desvio padrão e a relação EPC/ENC detectados neste ensaio, estão dispostos nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Na tabela 2 verifica-se que a aplicação das concentrações de 10, 20 e 30 mg/kg p. c. da solução aquosa do ipê roxo, apresentou um reduzido número de MNs, sendo o menor valor (1,6) encontrado no grupo tratado com a dose de 20 mg. No entanto, na comparação entre estes três grupos, verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os números de MNs encontrados, além disso, a relação EPC/ENC destes grupos foi semelhante.

O número de MN em EPC nas amostras dos grupos que receberam as três doses da solução aquosa do ipê roxo, não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) em relação à média de MNs detectados no grupo controle negativo a qual foi de 1,2. No entanto, em relação ao grupo controle positivo as diferenças foram significativas ($p < 0,05$). O valor médio de MNs contabilizados a cada 1000 EPC no grupo controle positivo foi de 15,4 e a média nos três grupos tratados com a solução do ipê roxo foi de 2,5 1,6 e 2,6 respectivamente.

Também, comparando-se os grupos controle positivo e negativo, verificou-se que houve diferenças significativas, uma vez a média de MNs detectada no grupo controle positivo foi de 15,4 e 1,2 para o negativo. Além disso, comparando-se a relação EPC/ENC destes dois grupos, a qual foi de 0,85 para o controle negativo e 0,41 para o positivo, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 2. Frequência de MNEPC e relação entre EPC/ENC após 24 horas do tratamento com diferentes concentrações da solução aquosa do ipê-roxo e controles

Doses	MNEPC				
	Nº de animais	Dados Individuais MN /1000EPC	%	Média ± Valor de P no desvio padrão MN/1000 EPC	Relação EPC/ENC
Solução do Ipê-Roxo 10 mg/kg	5	3-2-3-2-3	0,25	2,5 ± 0,5 ^a	0,81
Solução do Ipê-Roxo 20 mg/kg	5	2-2-1-1-2	0,16	1,6 ± 0,5 ^a	0,80
Solução do Ipê-Roxo 30 mg/kg	5	1-2-2-1-2	0,26	2,6 ± 0,5 ^a	0,81
Controle negativo - água destilada estéril	5	2-0-2-1-1	0,12	1,2 ± 0,7 ^a	0,85
Controle positivo - Mitomicina-C 4mg/kg	5	15-19-14-13-16	1,54	15,4 ± 2,3 ^b	0,41

^a $P > 0,05$; ^b $P < 0,05$. Todos os resultados (teste e controle positivo) foram comparados com o grupo controle negativo. * Controle negativo: água destilada estéril.

Para avaliação da possível atividade antimutagênica da solução aquosa do ipê roxo, foi empregado o tratamento simultâneo de três diferentes doses desta substância com o controle positivo. Na tabela 3, comparando-se a frequência de MNEPC detectada no controle negativo com os valores presentes nos grupos tratados com as três doses do ipê roxo concomitante a MMC (4 mg/kg p.c.), observa-se que houve diferença ($p < 0,05$).

As frequências de MNEPC para as soluções do ipê roxo mais 4 mg/kg de MMC não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle positivo. A média de MNs detectada nos grupos tratados com as soluções de 10, 20 e 30 mg do ipê roxo junto à MMC foram de 15,4 13,4 e 14,6 respectivamente, e o valor detectado no controle positivo foi de 15,4. Portanto, os dados sugerem que a diferentes doses da solução aquosa do ipê roxo empregadas neste estudo, não apresenta atividade redutora de mutagenicidade provocada pela MMC, uma vez que, a frequência de MNs em EPC e ENC encontrados nas amostras dos grupos Teste e MMC foram semelhantes.

Tabela 3. Frequência de MNEPC e relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com MMC e solução de Ipê-Roxo e controles

Doses	Nº de animais	Dados Individuais MN /1000EPC	MNEPC		Relação EPC/ENC
			%	Média ± Valor de P no desvio padrão MN/1000 EPC	
Solução do Ipê-Roxo 10 mg/kg + Mitomicina C 4mg/kg	5	10-19-11-13-15	1,54	15,4 ± 2,3 ^a	0,34
Solução do Ipê-Roxo 20 mg/kg + Mitomicina C 4mg/kg	5	10-16-13-14-14	1,34	13,4 ± 2,2 ^a	0,32
Solução do Ipê-Roxo 30 mg/kg + Mitomicina C 4mg/kg	5	13-15-17-16-12	1,46	14,6 ± 2,1 ^a	0,48
Controle negativo - água destilada estéril	5	2-0-2-1-1	0,12	1,2 ± 0,7 ^b	0,85
Controle positivo - Mitomicina-C 4mg/kg	5	15-19-14-13-16	1,36	15,4 ± 3,6 ^a	0,41

^a $P > 0,05$; ^b $P < 0,05$. Todos os resultados (testes e controle negativo) foram comparados com o grupo controle positivo.

6. DISCUSSÃO

6.1 Angiogênese pelo ensaio da MCA

Através dos resultados obtidos no teste da angiogênese em MCA de ovos embrionados, verificou-se que a solução aquosa do ipê roxo na concentração de 10mg/ml, promoveu atividade angiogênica. Os resultados demonstraram que a média percentual de vascularização obtida em membranas tratadas com esta substância, foi significativamente maior em relação aos valores detectados nos controles neutro e inibidor. Estes resultados apresentam um ineditismo na literatura uma vez que, não foram detectados estudos relativos à potencial atividade angiogênica da solução aquosa do ipê roxo pelo ensaio da MCA.

Através da utilização do ensaio da angiogênese na MCA de ovos embrionados, foi detectado que outras espécies vegetais podem promover o efeito angiogênico. Importantes exemplos são o látex das espécies *Hancornia speciosa*, *Euphorbia truralli* e *Hevea brasiliensis*, e o extrato etanólico das flores da *Calendula officinalis* (MAGNO *et al.*, 2008; PARENTE, 2009; BESSA, 2010; MELO-REIS *et al.*, 2010).

Considerando que o processo cicatricial está relacionado à atividade angiogênica, alguns estudos apontam que o extrato do ipê roxo apresenta importante contribuição em processos de reparo tecidual. Coelho e colaboradores verificaram que o extrato do ipê roxo é capaz de promover completa epitelização em feridas cutâneas de camundongos em 14 dias (BALBINO *et al.*, 2005; COELHO *et al.*, 2010). Neste sentido, o efeito angiogênico da solução aquosa do ipê roxo detectado no presente estudo, firma os resultados de pesquisas da investigação do potencial cicatrizante desta planta.

Os dados verificados neste estudo podem sugerir que o aumento da rede vascular das MCAs tratadas com a solução aquosa do ipê roxo se deve a seus compostos. Estudos apontam que a casca deste vegetal apresenta

componentes como as furano-naftoquinonas, quinonas, naftoquinonas, ácido benzóico, derivados de benzaldeído, dialdeídos, ciclopenteno e flavonóides (PARK *et al.*, 2003). A literatura relata que alguns flavonoides, como os da *Camellia sinensis*, apresentam atividade cicatrizante em lesões induzidas cirurgicamente em camundongos. Também as naftoquinonas Lapachol e β Lapachona são consideradas importantes compostos de ação cicatricial (VIEIRA *et al.*, 2008; BUSTAMANTE *et al.*, 2014). Estes dados relativos à composição fotoquímica da casca do ipê roxo somado as atividades cicatriciais promovidas por tais compostos, e os resultados detectados neste estudo inferem que a solução aquosa da casca do ipê roxo, apresenta compostos que promovem o aumento vascular na MCA de ovos embrionados.

6.2 Mutagenicidade e Antimutagenicidade pelo teste do micronúcleo

Neste estudo, os resultados pelo teste do MN demonstraram que as diferentes doses da solução aquosa do ipê roxo não apresentaram efeito mutagênico na medula óssea de camundongos, uma vez que o valores médios de MN em EPC encontrados nos grupos que receberam estas doses, foram semelhantes ao controle negativo. Além disso, na comparação da frequência de EPC e ENC, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com as diferentes concentrações da solução aquosa e o controle negativo, evidenciando assim, a ausência de citotoxicidade.

Do mesmo modo, todos os grupos de animais que receberam o tratamento simultâneo da solução aquosa junto a MMC, apresentaram valores de MN em EPC muito próximos em comparação aos dados observados no grupo de animais tratado apenas com a MMC. Portanto, a ausência de antimutagenicidade foi verificada neste estudo. Estes resultados estão em conformidade com os dados de Lourenço e colaboradores. Em sua pesquisa utilizando diferentes concentrações do extrato da flores do ipê roxo, pelo ensaio do micronúcleo, não foram detectadas as atividades mutagênica e antimutagênica na medula óssea de camundongos (LOURENÇO *et al.*, 2010).

Em geral, os compostos antimutagênicos possuem atividade antioxidante e atuam sequestrando os radicais livres de oxigênio quando administrados como pré-tratamento ou em simultaneidade com algum agente que induz as mutações no DNA (STURBELLE *et al.*, 2008). Estudos indicam que a nafatoquinona Lapachol presente na casca do deste vegetal é capaz de inibir a oxidação e a fosforilação mitocondrial, assim como a oxidase succínica (ARAUJO *et al.*, 2002). Contudo, a maior parte dos modelos para estudos de atividade antitumoral utiliza culturas primárias de células tumorais humanas. Segundo Eyoung *et al* (2008) esta ação nem sempre pode ser extrapolada para as condições *in vivo*, em virtude da toxicidade gerada pelas drogas anticancerígenas, como a MMC. A atividade anticâncer do lapachol foi detectada pelo CCNS (Cancer Chemotherapy National Service, dos Estados Unidos da América do Norte) em 1962 e desde esta descoberta, este composto tem sido utilizado em vários modelos experimentais de neoplasias.

Considerando que no presente estudo não foi verificada as ações mutagênica e antimutagênica da solução aquosa do ipê roxo, é importante ressaltar que a interação entre os compostos ou mesmo as condições empregadas neste trabalho, podem ter ocasionado a ausência destas ações. A variedade dos constituintes presentes na casca do ipê roxo e a resposta final para a atividade biológica esta sujeita ao resultado dos efeitos sinérgicos, adversos além de outras atividades interativas entre os compostos biologicamente ativos (LOURENÇO *et al.*, 2010). Ainda, diversos químicos, como os flavonoides, podem apresentar efeitos mutagênicos ou antimutagênicos dependendo das condições avaliadas (SANTOS & SALANTINO, 2000; LABIENIEC *et al.*, 2003; ZEIGER, 2003).

Considerando a detecção de atividade angiogênica da solução aquosa do ipê roxo, este estudo complementa as pesquisas de avaliação de atividade cicatricial deste vegetal, além de demonstrar a necessidade da condução de novos estudos que melhor esclareçam sua atuação na atividade antimutagênica em ensaios *in vivo*, uma vez que esta planta possui importantes constituintes de efeito antitumoral. Além disso, a condução de novos estudos baseados nas características verificadas neste estudo pode tornar viável o uso da solução aquosa do ipê roxo na produção de novos fármacos com

peculiaridades diferentes daqueles disponibilizados atualmente no mercado farmacêutico.

7. CONCLUSÕES

- A solução aquosa do Ipê roxo apresentou atividade angiogênica na MCA;
- Não apresentou as atividades mutagênica e antimutagênica nas dosagens testadas pelo ensaio do micronúcleo.

8. REFERÊNCIAS

AERTS, R. J.; SNOEIJER, W.; VAN DER MEIJDEN, E.; VERPOORTE, R. Allelopathic inhibition of seed germination by *Cinchona* alkaloids? **Phytochemistry**, v. 30, p. 2947-2951, 1991.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Questionable methods of cancer management: 'nutritional' therapies. **CA Cancer J Clin.**, v. 43, p. 309-319, 1993. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/canjclin.43.5.309/pdf>> Acesso: 12 Maio 2014.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science**, v. 221, p.1256-1263, 1983.

AMUCC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PORTADORES DE CÂNCER. Tipos de câncer. Câncer de A a Z, 2011. Disponível em: <<http://amucc.org.br/?opcao=avulsa&id=14>>. Acesso em: 14 jun 2014.

ANDERSON, D.; BASARAN, N.; BLOWERS, A.; EDWARDS, A. J. The effect of Antioxidants on Bleomycin Treatment In *In Vitro* And *In Vivo* Genotoxic Assays. **Mutation Research**, v. 329, p. 37- 47, 1995.

ANGELIS, R. C. Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidades degenerativas. São Paulo, Ed. Atheneu, 2001. 295p.

ARAUJO E. L.; ALENCAR, J. R. B.; ROLIM-NETO, P. J. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 57-59, 2002.

BALBINO, A. B.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BERNTHSEN, A. **Organic Chemistry**, Ed. Blackie & Son Ltd., New York Public Library, 1891.

BESSA, G. de O. **Avaliação da atividade angiogênica e do potencial de cicatrização do látex de *Euphorbia tirucalli* (aveloz)**. 2010. 50f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2010.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, p. 377-416, 1984.

BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; ASSIS, M. A.; AVELAR, K. E. S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidante activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASILEIRO, B. G.; PIZZIOLLO, V. R.; MATOS, D. S.; GERMANO, A. M.; JAMAL, C. M. Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no "Programa de Saúde da Família", Governador Valadares, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, 2008.

BUSTAMANTE, A. A. B.; ALVS, M. T. S.; OLIVEIRA, F. C. F.; ELIODORIO, M. E. de. A.; ALVES, M. C. S.; SANTANA, M. D. R. Ações terapêuticas do lapachol. Resumo *In*: VI Semana de Iniciação Científica da Faculdade de Juazeiro do Norte, 2014.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapics). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: Embrapa/CNPQ, 1994. 640 p.

CASTELLANOS, J. R. G; PRIETO, J. M; HEINRICH, M. Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)-a global ethno pharmacological commodity? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 12, n. 121(1), p. 1-13, 2009.

CASTRO, D. B.; SANTOS, D. B.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C.; CHEN-CHEN, L. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochiospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 3, p. 15-19, 2004.

CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Parte do Curso de Fitoquímica ministrado no XIV Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil - Florianópolis - SC - Setembro de 1996.

COELHO, J. M.; ANTONIOLLI, A. B.; SILVA, N. D.; CARVALHO, T. M. M. B.; PONTES, E. R. J. C.; ODASHIRO, A. N. Effects of silver sulfadiazine, ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*) extract and barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) extract on cutaneous wound healing in rats. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, p. 45-51, 2010.

CORDELL, G. A. **Introduction to alkaloids: A Biogenetic approach**. Nova York: John-Wiley & Sons, p. 208, 1981.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p.564-82, 1999.

CRITOFANILLI, M.; CHARNSANGAVEJ, C.; HORTOBAGYI, G. N. Angiogenesis modulation in cancer research: Novel clinical approaches. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.1, p. 415-426, 2002.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN B.; GRUISSEM W;; JONES R. (Eds.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p.1250-1318, 2000.

DOUGLAS, C. R. **Patofisiologia geral**. Mecanismo da doença. São Paulo: Robe Editorial, 2000. 1392p.

ETTORI, L. C.; SIQUEIRA, A. C. M. F.; SATO, A. S.; CAMPOS, O. R. Variabilidade genética em populações de ipê-roxo - *Tabebuia heptaphylla* (Vell.) Tol. - para conservação *ex situ*. **Revista do Instituto Florestal**, v.8, n.1, p.61-70, jul.1996.

EYONG, K. O.; KUMAR, P. S.; KUETE, V.; FOLEFOC, G. N.; NKENGFAK, E. A.; BASKARAN, S. Semisynthesis and antitumoral activity of 2-acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 20, p. 5387-5390, 2008.

FIRMO, W da. C. A. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cad. Pesq.**, v. 18, n. especial, dez. 2011.

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 10931-4, 1992.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. B. de. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, 2008.

GARCIA, E. S. Fitoterápicos: biodiversidade, perspectivas e oportunidades tecnológicas. 1996.

GASPERIN, S. I.; BOING, A. F.; KUPEK, E. Cobertura e fatores associados à realização do exame de detecção do câncer de colo de útero em área urbana no Sul do Brasil: estudo de base populacional. *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 27(7): 1312-1322, jul, 2011.

GONZÁLEZ, R. P.; LEYVA, A.; MELO, R. A. B.; MOREIRA, R. D. M.; PESSOA, C.; FARIAS, R. F.; MORAES, M. O. Método para o estudo *in vivo* da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 15, p. 168-173, 2000.

GOODMAN & GILMAN. 2003. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª edição. McGraw-Hill Interamericana do Brasil. Rio de Janeiro.

GUANANDI, M. Ipê roxo (Ype- *Tabebuia impetiginosa*) trumpet tree- brazilian walnut. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/mauroguanandi/2630738317/in/set-72157605453405499/>>. Acesso em: 12 jun 2014.

GUIRAUD, P.; STEIMAN, R.; CAMPOS, G. M. T.; SEIGLE, F. M.; SIMEON de BUOCHBERG, M. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and β -Lapachone. Letters. **Planta Medica**, v. 60, p. 373-374, 1994.

HALL, S. C.; LARSEN, H. O.; POULIOT, M. People, plants and health: a conceptual framework for plant consumption. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 8, n. 43, 2012.

HALLIWELL, B. & GUTTERRIDGE, J. M. C. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine. 2ª ed., claredon Press. Oxford.

HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**. London: Academic Press, 1988.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products, In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). **Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products**. London: Imperial College, p.1-25. 1999.

HARRINGTON, J. F. Seed storage and longevity. In: KOSLOWSKI, T.T. **Seed biology**. New York: Academic Press, v.3, p.145-245. 1972.

HEINZMANN, B. M; BARROS, F. M. C de.; Potencial das plantas nativas brasileiras para o desenvolvimento de fitomedicamentos tendo como exemplo lippia alba (mill.) N. E. Brown (verbenaceae). **Revista do Centro de Ciências da Saúde**, v. 33, n. 1, p 43-48, 2007.

HIGA, R. A. **Estudo da ação antineoplásica do Ipê roxo na carcinogênese induzida pelo azoximetano em camundongos**. 2007. 51f. Dissertação

(Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2007.

HIRAMATSU, N; XIUFEN, W; TAKECHI, R.; ITOH, Y.; MAMO, J; PAL, S. Antimutagenicity of Japanese traditional herbs, gennoshoko, yomogi, senburi and iwa-tobacco. **BioFactors**, v. 22, p. 123–125, 2004.

HOEFFEL, J. L. de M; GONÇALVES, N. de M.; FADINI, A. A. B.; SEIXAS, S. R. da C. Conhecimento tradicional e uso de plantas medicinais nas Apas's Cantareira/sp e Fernão Dias/mg. *Revista VITAS – Visões Transdisciplinares sobre Ambiente e Sociedade*, Nº 1, setembro de 2011.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS-FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicina for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

KEIGHLEY, M.R.B; WILLIAMS, N.S. *Cirurgia do ânus, reto e colo*. 1ª ed, 1998. Ed. Manole.

KHAN T. H.; PRASAD, L.; SULTANA, A.; SULTANA, S. Soy isoflavones inhibits the genotoxicity of benzo(a)pyrene in Swiss albino mice. **Human & Experimental Toxicology**, v. 24, p. 149-155, 2005.

Lafepe Lapachol. Lafepe, 2012. Bula de remédio

LAGROTA, M. H.; PINTO, A. V.; PINTO, M. de. C.; WIGG, M. D.; AGUIAR, A. N. Antiviral activity of naphthoquinones. I. lapachol derivatives against enteroviruses. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v. 29, p. 15-20, 1987.

LI, J.; OU-LEE, T. M.; RABA, R.; AMUNDSON, R. G.; LAST, R. L. Arabidopsis mutants are hypersensitive to UV-B radiation. **Plant Cell**, v. 5, p. 171-179, 1993.

LILIENFELD, S. O; HAL ARKOWITZ, H. Ervas para aliviar a ansiedade. Revista Scientific American, Mente Cérebro. Disponível em: <http://www2.uol.com.br/vivermente/artigos/ervas_para_aliviar_a_ansiedade.html> Acesso em: 20 Ago 2014.

LIRA, W. M. **Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico de extratos e compostos vegetais obtidos a partir dos gêneros *Byrsonima* e *Davilla***. 2007. 183f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2007.

LONGHI, R. A. **Livro das árvores: árvores e arvoretas do Sul**. 2.ed. Porto Alegre: L&PM, 1995. 176p.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2002. v.1, p.66.

LOURENÇO, J. A.; PITANGUI, C. P.; JORDÃO, A. A.; VANNUCCHI, H.; CECCHI, A. O. Absence of mutagenicity and antimutagenicity of the extract obtained from the flowers of "ipê roxo" *Tabebuia impetiginosa* (Mart. ex DC.) Standl. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.4, 2010.

MAGNO, L. N.; ALMEIDA, L. M.; GONÇALVES, P. J. Látex de *Hancornia speciosa* para aplicações biomédicas: propriedades físico-químicas, avaliação de biocompatibilidade e atividade angiogênica. *In: XIX Congresso Brasileiro de Física Médica, Universidade Federal de Goiás, Goiânia – GO, 2014.*

MELO-REIS, P. R.; ANDRADE, L. S.; SILVA, C. B.; ARAÚJO, L. M. M.; PEREIRA, M. S.; MRUE, F.; CHEN-CHEN, L.. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax látex. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 1, p. 189-194, 2010.

Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Web site. Pau D'arco. Disponível em: <<http://www.mskcc.org/cancer-care/herb/pau-d-arco> on July 27, 2012.>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Diretrizes para a Vigilância do Câncer Relacionado ao Trabalho, 2011. Disponível em:

<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/diretrizes_cancer_ocupa.pdf>. Acesso em: 12 jun 2014.

MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of Wood/Biomass for Biooil: A Critical Review. **Energy & Fuels**, v. 20, p. 848–889, 2006.

MOHAN, N. & MELTZ, M. L. Induction of nuclear factor after low dose Ionizing radiation involves a reactive oxygen intermediate signaling pathway. **Radiation Research**, v. 140, n. 1, p. 97-104, 1994.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 3, 2009.

MONTENEGRO, M. A; NEGRETTE, M. S; LERTORA, W. J; CATUOGNO, M. S. Focos decriptas displásicas inducidas com 1,2dimetilhidrazina em intestino grosso de ratas tratadas com molib de noy tungsteno. **Rev Vet.** v.14, n. 1, 2003.

MORAIS, S. M. de.; DANTAS, J. D. P.; SILVA, A. R. A. da.; MAGALHÃES, E. F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, 2005.

MOREIRA, R. R. D.; SAANTOS, L. E.; VARELLA, S. D.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Euriocaulaceae) e dos compostos flavonóidicos 7-metoxilados relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n.1, p. 11-19, 2002.

MORITA, M.; SHIBUYA, M.; KUSHIRO, T.; MASUDA, K.; YUTUKA, E. Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*). **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 3453-3460, 2000.

NOGUEIRA, F. L. P.; FERNANDES, S. B. O.; REIS, G. M.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D.; LAGE, C. L. S.; MANEZES, F. S. Atividade analgésica e anti-edematogênica de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae) selvagem e obtida por micropropagação. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, 2005.

NOVAIS, T. S. Atividade antimicrobiana em alguns extratos de vegetais de semi-árido brasileiro. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v. 13, supl. 2, p. 5-7, 2003.

OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; MIRAGLIA, M. C. M.; MESQUITA, A. A. L.; ZANI, C. L.; FERREIRA, D. T.; MAIA, J. G. S. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniaceas brasileiras. **Química Nova**, v.13, p.302-307, 1990.

OLIVEIRA, M. F; LEMOS, T. L. G; MATTOS, T. A. S; SANTIAGO, G. M. P; BRAZFILHO, R. New enamine derivatives of lapachol and biological activity. *An. Acad. Bras. Ciênc.* vol. 74, no.2, Rio de Janeiro, 2002.

PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. **The American Journal of Physiology**, v. 282, p. 947-70, 2002.

PARENTE, L. M. L.; SILVA, M. S. B.; BRITO, L. A. B.; LINO-JÚNIOR, R. S.; PAULA, J. R.; TREVENZOL, L. M. F.; ZATTA, D. T.; PAULO, N. M. Efeito cicatrizante e atividade antibacteriana da *Calendula officinalis* L. cultivada no Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11 n.4, 2009.

PARK, B. S.; LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T.; LEE, S.; TAKEOKA, G. R. Antioxidant activity and characterization of volatile constituents of Taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n.1, p.295-300, 2003.

PEPPER, M. S. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, p. 1104-1117, 2001.

REITZ, R.; KLEIN, R. M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, 1988. 524 p.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medulla óssea de roedores *in vivo*. In: *Mutagênese Ambiental* (Ribeiro LR, Salvadori, DMF & MARQUES, EK). Editora ULBRA, p. 173-200, 2003.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v. 386, 1997, p. 671-674, 1997.

RUSCHEL, A.R.; NODARI, R.O. Colheita foliar da cancorosa [*Sorocea bonplandii* (Baill.) Burg., Lanj. & W. Boer]: uma espinheira-santa da Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n. 4, p.43-50, 2008.

SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; SERAFINI, S. A.; BUENO, M.; CRIPPA, L. B.; SARTORI, V. C. Antifungal effect of *Schinus molle* L., Anacardiaceae, and *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, essential oils of Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 154-159, 2010.

SANTOS, D.Y.A.C.; SALANTINO, M.L.F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v.55, n.6, p.567-73, 2000.

SCHNEIDER, P. S. P.; SCHNEIDER, P. R.; FINGER, C. A. G. Crescimento do ipê-Roxo, *Tabebuia Impetiginosa* Martius Ex A. P. De Candolle, na depressão central do estado do Rio Grande do Sul. **Ciência Florestal**, v. 10, n. 2, p. 91-100, 2000.

SHANLEY, P.; SERRA, M.; MEDINA, G. **Frutíferas e Plantas úteis na vida Amazônica**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2ª Ed. Revista e Ampliada. Centro Internacional para Pesquisa Florestal (Cifor), Brasil. 2010, 19 p.

SILVA, I. M.; PEIXOTO, A. L. O abajurú (*Chrysobalanus icaco* L. e *Eugenia rotundifolia* Casar) comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1B, p.325-32, 2009.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V.F; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β lapachona e derivados. **Quím.Nova**. vol.26 no.3, São Paulo. May/June 2003.

SIQUEIRA, A. C. M. F.; NOGUEIRA, J. C. B. Essências brasileiras e sua conservação genética no Instituto Florestal de São Paulo. **Revista do Instituto Florestal**, v.4, n.4, p.1187, 1992. Edição dos Anais do CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, São Paulo, 1992. Edição especial.

STURBELLE, R. T.; PINHO, D. S.; RESTANI, R. G.; OLIVEIRA, G. R.; GARCIAS, G. de L.; ROTH, M. da G. M. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *Aloe vera* em teste de *Allium cepa* e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n.3, p. 409-415, 2010.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A.C. O Gênero *Copaifera* L. **Química nova**, v. 25, n. 2, p. 273-86, 2002.

VIEIRA, A. P.; SANTOS, N. R. dos.; BORGES, J. H. S.; VINCENZI, M. P. A.; SCHMITZ, W. O. Ação dos flavonóides na cicatrização por segunda intenção em feridas limpas induzidas cirurgicamente em ratos Wistar. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 65-74, 2008.

VILELA, J. D. Mummification and medicine in ancient Egypt. **Revista Paulista de Medicina**, v. 89, n. 115, 1977.

VON DER PAHLEN, M. C. Pau d'arco (*Tabebuia* spp.). In Shanley P; Pierce, A. R; Laird, S.A; Guillen, A (eds). *Tapping the Green Market: Certification and Management of Non-Timber Forest Products*. Earthscan, Sterling, Va. 2002, p. 89-90.

WOO, H. J; PARK, K. Y; RHU, C. H. Beta-lapachone, a quinone isolated from *Tabebuia avellanedae*, induces apoptosis in HepG2 hepatoma cell line through induction of Bax and activation of caspase. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, p. 161-168, 2006.

YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Revista Química Nova*. vol. 21 n°1 São Paulo Jan./Feb. 1998.

ZEIGER, E. Illusions of safety: antimutagens can be mutagens, and anticarcinogens can be carcinogens. **Mutation Research**, v. 543, n.3, p.191-194, 2003.