



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANGIOGÊNICA/ANTIANGIOGÊNICA E
MUTAGÊNICA/ANTIMUTAGÊNICA DO LÁTEX DO *Himatanthus*
obovatus (TIBORNA)**

MARIA ALICE MONTES DE SOUSA

Goiânia - GO

2017

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES
ANGIOGÊNICA/ANTIANGIOGÊNICA E
MUTAGÊNICA/ANTIMUTAGÊNICA DO LÁTEX DO *Himatanthus*
obovatus (TIBORNA)**

MARIA ALICE MONTES DE SOUSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis.

Goiânia - GO

2017

S725a Sousa, Maria Alice Montes de,
Avaliação das atividades angiogênica/antiangiogênica
e mutagênica/antimutagênica do látex do himatanthus
obovatus (tiborna) manuscrito]/ Maria Alice Montes
de Sousa.-- 2017.

54 f.; il. 30 cm

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade
Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto
Sensu em Ciências Ambientais e Saúde Goiânia, Ano

Inclui referências f. 44-52

1. Medicina popular. 2. Plantas medicinais - Cerrados.
I.Reis, Paulo Roberto de Melo. II. Pontifícia Universidade
Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 615.89(043)



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 15 DE MARÇO DE 2017 E CONSIDERADA
APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

1)

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

2)

Prof. Dra. Carolina Ribeiro e Silva / UFG (Membro Externo)

3)

Prof. Dr. Clayson Moura Gomes / PUC Goiás (Membro)

4)

Prof. Dr. Cléver Gomes Cardoso / UFG (Suplente)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, ao meu pai Carlos Lacerda de Sousa, à minha mãe Marilete dos Reis Montes e Sousa, que não mediram esforços, sempre estão ao meu lado dando força e motivo de inspiração e sucesso. Às minhas irmãs Anna Vitória e Elizândra Eduarda que tanto amo. Aos meus padrinhos Mario e Neirivâine que me acolheram como filha. Aos meus avôs que são meus exemplos e a todos pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, que me iluminou nessa trajetória. Ao meu orientador e eterno professor Paulo Roberto de Melo Reis que sempre me ajudou e me orientou não somente neste trabalho, mas na vida pelo seu grande exemplo.

Aos meus pais, Carlos Lacerda de Sousa e Marilete dos Reis Montes e Sousa, que não mediram esforços, sempre estão ao meu lado dando força e motivo de inspiração e sucesso. Às minhas irmãs Anna Vitória e Elizandra Eduarda que tanto amo. Aos meus padrinhos Mario e Neirivãine que me acolheram como filha. Aos meus avôs que são meus exemplos e a todos pelo apoio incondicional.

Às minhas amigas Ana Paula Maia e Susy Ricardo Lemes que me apoiaram em todas as horas de estudo e que tanto me ajudaram em todas as etapas.

À todos meus amigos e colegas do Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos - LEB.

Aos professores Carolina Ribeiro e Silva, Clever Gomes Cardoso e Pablo José Gonçalves por cederem os seus laboratórios para a realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de Goiás pela concessão da bolsa de estudo.

À todos que colaboraram diretamente e indiretamente na minha formação e a todos que colaboraram com a realização deste estudo.

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível,
em breve estarás fazendo o impossível.”*

São Francisco de Assis

RESUMO

O *Himatanthus obovatus*, popularmente conhecida por Tiborna, é uma planta do cerrado utilizada na medicina popular para tratamento de verminoses, infecção intestinal, como depurativo do sangue, cicatrizante, analgésico, antimicrobiano e anti-inflamatório. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade angiogênica/antiangiogênica e mutagênica/antimutagênica do látex de *H. obovatus* através do modelo experimental de ensaio na membrana corioalantóidea (MCA) e o ensaio de mutagenicidade de Ames. Os resultados do ensaio de angiogênese indicaram que o látex de *H. obovatus* nas concentrações 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20 μL , apresentou um aumento significativo na área de porcentagem da rede vascular na MCA, quando comparados aos grupos controles negativo (água) e inibidor (dexametasona). Quando comparado ao controle positivo (Regederm) não demonstrou diferença significativa com o látex. No ensaio de Ames, o látex foi testado em três concentrações (1:2, 1:5 e 1:10 $\mu\text{L}/\text{placa}$). Os resultados demonstraram que o látex de *H. obovatus* apresentou ação mutagênica em todas as concentrações. A análise antimutagênica do látex nas concentrações foram comparadas com o controle positivo (azida sódica), os resultados das concentrações 1:2, 1:5 e 1:10 não diminuiu uma diminuição significativamente no número de colônias revertentes ($p>0,05$), mas observou-se uma porcentagem de inibição considerável indicando ação antimutagênica do látex de *H. obovatus*. A composição fito-química do látex pode indicar o motivo deste efeito antimutagênico, a presença de terpenos e iridóides. Concluiu-se que o látex de *H. obovatus* apresentou atividade angiogênica em todas as concentrações testadas e na atividade mutagênica em todas as concentrações testadas.

Palavras - chaves: Angiogênese, *Himatanthus obovatus*, Membrana Corioalantóide, Mutagênese.

ABSTRACT

Himatanthus obovatus, popularly known as Tiborna, is a cerrado plant used in popular medicine for treating verminoses, intestinal infection, as a blood purifying, healing, analgesic, antimicrobial and anti-inflammatory. This study aimed to evaluate the angiogenic/antiangiogenic and mutagenic/antimutagenic activity of *H. obovatus* latex through the experimental model of the chorioallantoic membrane (MCA) assay and the Ames mutagenicity assay. The results of the angiogenesis assay indicated that the latex of *H. obovatus* at concentrations 1: 2, 1: 5, 1:10 and 1:20 μL showed a significant increase in the percentage area of the vascular network in the MCA, when compared to negative (Water) and inhibitor (Dexamethasone) groups. When compared to the positive control (Regederm) did not demonstrate significant difference with the latex. In the Ames assay, the latex was tested at three concentrations (1: 2, 1: 5 and 1:10 $\mu\text{L}/\text{plate}$). The results demonstrated that the latex of *H. obovatus* presented mutagenic action in all concentrations. The antimutagenic analysis of the latex at concentrations was compared with the positive control (sodium azide), the results of concentrations 1: 2, 1: 5 and 1:10 did not decrease a significant decrease in the number of revertant colonies ($p > 0,05$), But a considerable inhibition percentage was observed indicating antimutagenic action of the latex of *H. obovatus*. The phytochemical composition of the latex may indicate the reason for this antimutagenic effect, the presence of terpenes and iridoids. It was concluded that the latex of *H. obovatus* showed angiogenic activity in all concentrations tested and in the mutagenic activity in all concentrations tested.

Key words: Angiogenesis, *Himatanthus obovatus*, Chorioallantoic Membrane, Mutagenesis.

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

®	Marca Registrada
% v/v	Percentual volume/volume
BOD	Estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
MCA	Membrana Corioalantóide
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EAO	Espécies Ativas de Oxigênio
IV-FT	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
MEVB	Meio Mínimo Glicosado
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI (%)	Porcentagem de Inibição da Mutagenicidade
PRPPG	Unidade de Conservação - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG/UFG
RM	Razão de Mutagenicidade
TGA	Análises termogravimétricas
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia da flor e folha de <i>H. obovatus</i>	18
Figura 2. Tiborna – <i>H. obovatus</i>	19
Figura 3. Box plot dos valores do comprimento, número de junções, calibre e número de complexos das MCAs obtidas após tratamento com o látex da tiborna e controles	29
Figura 4. Imagens representativas da rede vascular formada na região corioalantóide Membrana (MCA) após tratamento com o látex de <i>H. obovatus</i>	30
Figura 5. Fotomicrografia dos cortes histológicos da membrana corioalantoide do ovo embrionado de galinha – grupo controle	32
Figura 6. Fotomicrografia dos cortes histológicos da membrana corioalantoide do ovo embrionado de galinha – grupo teste	33
Figura 7: Espectro de IV-FT para as amostras de Bm e Lt	37
Figura 8: Curvas TGA das amostras analisadas	38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Médias e desvios padrões obtidos na mensuração do comprimento, do calibre e do números de junções dos vasos sanguíneos 27
- Tabela 2** - Análise histológica das MCAs apresentando Média \pm desvio padrão (DP) dos parâmetros histológicos classificados em uma escala de 0-3..... 31
- Tabela 3 - Tabela 3.** Média e desvio padrão (DP) de revertentes histidina, razão de mutagenicidade (RM) e porcentagem de inibição de mutagenicidade (PI) para a cepa de *S. typhimurium*, TA100, tratadas com três doses do látex de *H. obovatus*..... 34
- Tabela 4:** Resultado da determinação empírica de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio..... 36

SUMÁRIO

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XI
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	144
2.1 Plantas Medicinais	14
2.2 Plantas com atividade angiogênica	155
2.3 Plantas com atividade mutagênica e antimutagênica	155
2.4 Família Apocynaceae	166
2.4.1 Gênero <i>Himatanthus</i>	177
2.4.1.1 <i>Himatanthus obovatus</i>	177
3 OBJETIVOS.....	20
3.1 Objetivos específicos.....	20
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Látex do <i>Himatanthus obovatus</i>	21
4.2 Teste da Angiogênese.....	21
4.2.1 Ovos embrionados de galinha.....	21
4.2.2 Substâncias utilizadas.....	21
4.2.3 Procedimento experimental para avaliação “in vivo” da atividade angiogênica/ antiangiogênica.....	22
4.2.4 Análise histológica.....	22
4.2.5 Análise dos resultados.....	23
4.3 Teste de Mutagenicidade de Ames em cepas de <i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	23
4.3.1 Cepas bacterianas.....	23
4.3.2 Soluções, Reagentes e meios de Cultura.....	23
4.3.3 Procedimento Experimental para o teste de Ames.....	25
4.3.4 Análise dos resultados.....	25
4.4 Análise físico-química.....	26

4.4.1 Análise elementar.....	26
4.4.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-FT).....	26
4.4.3 Análises termogravimétricas (TGA).....	26
5 RESULTADOS.....	27
5.1 Avaliação da atividade angiogênica/antiangiogênica do látex extraído de <i>H. obovatus</i> pelo ensaio em MCA.....	27
5.2 Análise histológica da membrana corioalantóide.....	31
5.3 Teste de mutagenicidade Ames.....	34
5.4 Análise físico-química.....	36
6 DISCUSSÃO.....	39
7 CONCLUSÃO.....	43
8 REFERÊNCIAS.....	44
ANEXOS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Desde as antigas civilizações, se tem relatos do uso das plantas medicinais, relatado pelos historiadores como uma prática de sobrevivência, para curar e tratamento de doenças (ANDRADE et al, 2008). Até os meados do século XIX, ainda não se diferenciava a medicina popular, que era feita pela manipulação de plantas e extratos vegetais, com a medicina científica que faz a manipulação de medicamentos sintéticos (SCHENKEL et al., 2000). No Brasil, o uso das plantas medicinais começou pelos índios, europeus e africanos. Atualmente, essa prática é popular em sua cultura sendo passado pelas gerações (GALLO & KOREN, 2001).

As plantas medicinais são amplamente utilizadas para uso de diversas doenças, como anemia, doenças respiratórias, úlceras, verminoses, no auxílio da cicatrização de feridas e entre outras. A literatura tem mostrado que as plantas medicinais possuem inúmeras atividades comprovadas cientificamente como: analgésica, antitérmica, anti-inflamatória, antialérgica, antiparasitária e antibacteriana (PARENTE et al, 2012).

É crescente o interesse pelos estudos de análise das substâncias encontradas nas plantas, pois estas tem apresentado várias atividades biológicas contra fungos, bactérias, vírus e insetos (MACIEL, 2002; JONES, 2004; FUKUMASU, 2008).

Entre essas plantas está a *Himatanthus obovatus* a qual é uma árvore de médio porte arbustiva, que pertence à Família Apocynaceae. É nativa do cerrado na região Centro-Oeste e nas savanas amazônicas; tendo como nome popular “leiteira”, “tiborna” ou “Pau de leite” (CARMO, 2005).

Algumas propriedades terapêuticas do *H. Obovatus* relatados para o tratamento de herpes, úlceras e verminoses. Também é relatado pela população local que o látex do tronco tem poder cicatrizante e germicida. Se faz uso da casca da raiz, da folha, da madeira, da raiz, do látex do tronco e das folhas, sendo colocado com alto valor medicinal, na forma das populares “garrafadas” (para tratar verminoses, infecção intestinal e como depurativo do sangue) (COELHO, 2009).

A comercialização e a utilização do látex do *H. obovatus* desperta o interesse desta planta para estudos e aplicações na medicina popular. Entretanto, as plantas medicinais não são inofensivas quanto apresentam. Durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos naturais de defesa, como a síntese de substâncias químicas tóxicas e genotóxicas contra-ataques de bactérias, fungos, insetos e animais predadores (CASTRO et al., 2004; MELO-REIS et al., 2010).

A angiogênese se define como a formação de novos vasos sanguíneos por um processo de germinação de brotos endoteliais a partir de vasos capilares preexistentes (GONZALEZ et al., 2004). Este mecanismo está presente em vários processos fisiológicos como a cicatrização de feridas, o desenvolvimento de tumores e a embriogênese. Está presente também nos processos patológicos como artropatias crônicas, inflamação crônica, psoríase, retinopatia diabética, degeneração macular, angiofibroma, hemangioma, glaucoma vascular, crescimento tumoral, disseminação metastática e desenvolvimento de placa de ateroma (GONZALEZ et al., 2000; SAFATLE et al., 2002; LIEKENS, 2001; NOY, 2014).

Os produtos utilizados na alimentação humana provenientes de vegetais podem também apresentar o papel de agentes causais ou potencializadores no aumento da incidência do câncer, mas alguns podem agir como anticarcinogênicos. Muitos compostos mutagênicos e carcinogênicos podem estar relacionados à formação de espécies ativas de oxigênio (EAO) (BOREK, 1991; MOHAN & MELTZ, 1994; ANDERSON et al., 1995).

A mutagênese revela a alterações hereditárias e ocasionais nos genes, essas mutações são em grande parte prejudiciais ao ser humano por alterar o funcionamento fisiológico e danos irreversíveis ao DNA (IARC, 2000; FUKUMASU, 2008). A população se faz o uso de diversas substâncias, sem ter o conhecimento do risco que estão sendo expostas, como: agentes físicos, radiações ionizantes, agentes biológicos (vírus, bactérias e parasitas), conservantes alimentares industrializados e o uso de plantas medicinais.

Em virtude do intenso uso de plantas medicinais pela população, destaca-se a importância de aumentar os estudos científicos que validem seu uso seguro. Com esse propósito, o presente estudo avaliou os efeitos das atividades angiogênica/antiangiogênica e mutagênica/antimutagênica do látex de *H. obovatus*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas Medicinais

Os recursos naturais provindos dos vegetais são uma importante fonte de substâncias utilizadas pelo homem para o tratamento e prevenção de vários tipos de doenças (HALBERSTEIN, 2005). Essa prática constitui-se como uma das mais antigas empregadas pelo homem (VEIGA-JUNIOR & PINTO, 2008). Atualmente, os vegetais continuam sendo uma fonte de medicamentos, tanto tradicionais quanto industrializados (ANDRADE et al., 2008).

De acordo com a Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aproximadamente 80% da população mundial utiliza remédios à base de produtos naturais como recurso terapêutico e 85% destes faz o uso das plantas. A OMS estima que 252 drogas são consideradas de uso básico, destas drogas 11% são provenientes de plantas e um número relevante são drogas sintéticas a base de produtos de origem natural (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A diversidade da flora brasileira é uma grande fonte de recursos terapêuticos, acessível à população (GLASER, 1999; BRISKIN, 2000). Atualmente, os fitoterápicos representam uma forma alternativa para o tratamento de doenças em várias partes do mundo e uma fonte inesgotável de recursos naturais para obtenção de novos fármacos. No Brasil a situação não tem sido diferente. A imensa biodiversidade da nossa flora tem propiciado uma procura cada vez maior dos recursos advindos da natureza (SILVA et al., 2000).

O primeiro fármaco obtido dos vegetais foi a morfina da *Papaver somniferum* em 1803. A partir daí, outras substâncias foram isoladas, como por exemplo, a quinina e a quinidina obtidas da *Cinchona spp*, em 1819, e a atropina da *Atropa belladonna*, em 1831, que passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos vegetais (TUROLLA & NASCIMENTO, 2006).

A partir da década de 1960 a produção sintética de fármacos foi impulsionada nas indústrias farmacêuticas. Já em meados dos anos de 1980, o interesse pelos produtos naturais aumentou, principalmente devido aos avanços científicos associados à informática, que permitiram o desenvolvimento de metodologias com a finalidade de isolar substâncias ativas a partir de recursos naturais produzindo os fitoterápicos (RATES, 2001).

Apesar dos benefícios, os fitoterápicos podem ser prejudiciais, as plantas possuem mecanismos naturais de defesa, como a síntese de substâncias químicas tóxicas e genotóxicas. Muitos desses compostos já foram identificados como mutagênicos e carcinogênicos, entre

esses, podem ser citados flavonóides, hidrazinas, furocumarinas, quinonas, alcalóides de pirrolozidina e teobrominas (CASTRO et al., 2004; KHAN et al., 2005).

2.2 Plantas com atividade angiogênica

A angiogênese tem seus mecanismos controlados por fatores ativadores (angiogênicos) e inibidores (antiangiogênicos), que se desenvolve quando acontece algum estímulo que induz mudança nas células endoteliais de um estado de quiescência para um estado de replicação e migração, formando capilares (LIEKENS, 2001; SAFATLE et al., 2002). Os fatores angiogênicos atuam seletivamente sem afetar as funções de outras células, atuando na alteração das características das células estruturais do endotélio vascular, que interagem com a matriz extracelular por meio dos receptores de adesão à superfície celular gerando o processo de neovascularização (LIEKENS, 2001).

Recentemente, tem dado ênfase ao estudo das substâncias provenientes de plantas que apresentam propriedades angiogênica e antiangiogênica (JONES, 2004; FOLKMAN, 2004, MELO-REIS et al., 2010; ARAÚJO et al., 2015; BESSA et al., 2015).

As plantas com atividade angiogênica, possuem a capacidade de formar novos vasos sanguíneos através do estímulo de proliferação dos angioblastos, as plantas são usadas pela população para diversos tratamento como de isquemia e cicatrização de feridas. Em processos patológicos a angiogênese ocorre no crescimento tumoral, em doenças que ocorram inflamações e metástase (CHUNG, 2017). As plantas com atividade angiogênica *Hevea brasiliensis* (seringueira), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), *Tabebuia impetiginosa* (Ipê roxo), *Synadenium umbellatum* (cola-nota) e *Pterodon emarginatus* (sucupira) (ZIMMERMANN, 2007; MELO-REIS, 2010; LEMES, 2014; ARAUJO, 2015; CHAVES, 2016, MORAES, 2016;).

2.3 Plantas com atividade mutagênica e antimutagênica

As plantas possuem inúmeros compostos com diversas atividades desconhecidas, o seu uso sem conhecimento acarreta graves problemas ao organismo. Se a planta possuir atividade mutagênica ou quando administrada com outra substância potencializando o efeito ao organismo, causando danos ao DNA. As plantas com a atividade mutagênica conhecidas são *Parthenium hysterophorus*, *Myrciaria tenella*, *Smilax campestris*, *Tripodanthus acutifolius* e *Cassia corymbosa* (VARANDA, 2006).

Os produtos utilizados na alimentação humana que tem como origem as plantas, que podem agir casualmente ou como potencializadores no aumento da incidência do câncer, mas em alguns podem agir como anticarcinogênicos (ANTUNES, 1999; PERON et al., 2008).

Em contrapartida, existem nas plantas, substâncias que apresentam propriedades antimutagênicas como os beta carotenos (Vitamina A), ácido ascórbico (Vitamina C), o tocoferol (Vitamina E), polifenóis, compostos sulfídricos, cálcio, fibras, dentre outras (AMES, 1993; GOODMAN & GILMAN, 2003; CASTRO et al., 2004; HIRAMATSU et al., 2004). Muitos compostos antígeno-tóxicos encontrados nos alimentos são agentes antioxidantes e atuam sequestrando os radicais livres de oxigênio por serem moléculas instáveis e quimicamente reativas, prejudicando a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (MOHAN & MELTZ, 1994; ANGELIS, 2001; KHAN, 2005).

As substâncias antimutagênicas podem ser classificadas ou divididas em desmutagênicos que são substâncias que atua ao inativar as substâncias mutagênicas antes que elas atuem sobre o DNA e as substâncias bioantimutagênicos tem a capacidade inibir a mutação por interferirem sobre os processos metabólicos de reparação inerentes a célula (SLUPPHAUG et al., 2003).

2.4 Família Apocynaceae

A família Apocynaceae possui a maior quantidade de espécies e gêneros dentro das Angiospermas. São conhecidos atualmente um total de 424 gêneros, distribuídos em 5 sub-famílias: Apocynoideae, Asclepiadoideae, Periplocoideae, Secamonoideae, e Rauvolfioideae (ENDRESS, 2000; JUDD et al., 2002). É encontrada nas regiões tropicais e clima temperado em boa parte do planeta. No Brasil tem se uma vasta quantidade de espécies com cerca de 41 gêneros e 376 espécies. Grande parte das espécies produzem glicosídeos cardiotônicos responsáveis por agir diretamente no miocárdio, usado principalmente no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (ALLORGE et al., 1981).

A presença de vasos laticíferos para dificultar a ação de herbívoros “autodefesa” é uma característica distinta desta família (SANTOS, 2016). As flores são em formato de espiral ou lóbulos contorcidos e os frutos possuem muitas sementes e estão em pares (CHAN et al., 2016).

Uma das características da família Apocynaceae é a presença dos alcalóides indólicos e alcaloides indoloterpênicos, sendo presente especificamente na subfamília Rauvolfioideae (LIMA, 2005). As Apocynaceae têm grande relevância na pesquisa de novos fármacos, por apresentar presença de alcaloides. Os primeiros fármacos anticancerígenos comerciais dos

alcalóides vinblastina, vincristina e derivados da *Catharanthus roseus* (pervinca) (MOURA & AGRA, 1989).

2.4.1 Gênero *Himatanthus*

Este gênero foi descrito pela primeira vez pelo botânico australiano Joseph August Schultes e Johann Centurius von Hoffmannsegg no ano de 1819. Em seguida, o botânico Woodson realizou uma expedição aos herbários brasileiros e coletou material em diferentes regiões do Brasil e América do Sul, com a intenção de separar o gênero *Plumeria* e *Himatanthus*. Woodson definiu o gênero *Himatanthus* que significa “manto de flor”. Caracterizando o gênero *Himatanthus* como pertencente da família Apocynaceae, subfamília Rauvolfioideae (MORAGAS, 2006).

O gênero *Himatanthus* possui características distintas com duas brácteas amplas e persistentes envolvendo os botões florais. Dentro do gênero *Himatanthus* existem dois subgêneros inseridos em sua taxonomia: o *Obovatae*, que apresenta folhas obovais e oblongas e o limbo arredondado a obtuso na base, o *Lanceolatae* com folhas oblanceoladas ou espatuladas com base aguda mais ou menos atenuada no pecíolo, em suas folhas possui como característica a presença de lignanas e iridóide (MORAGAS, 2006).

2.4.1.1 *Himatanthus obovatus*

A espécie *Himatanthus obovatus* foi descrita na literatura em 1914 pelo botânico Müller Argoviensis, Johannes (Jean) e o americano Woodson, Robert Everard (IPNI, 2005).

Sua classificação botânica é:

Família: Apocynaceae

Subfamília: Rauvolfioideae Kostel

Tribo: Plumerieae E. Mey

Gênero: *Himatanthus* Willd. ex Schult

Subgênero: *Obovatae* Plumel

Espécie: *obovatus* (Muell. Arg.) Woodson.

Essa espécie vegetal é encontrada na América do Sul, principalmente no bioma cerrado. A família Apocynaceae apresenta como característica a produção de látex para dificultar a ação de herbívoros “autodefesa”. A maioria das espécies desta família tem a presença de alcalóides

indólicos e a subfamília Rauvolfioideae tem a presença de alcaloides indoloterpênicos (LIMA, 2005; SANTOS, 2016).

Sua característica estrutural apresenta uma filotaxia alternada com folhas simples, obovadas a elípticas, glabras ou papilosas, sésseis ou com pecíolo curto. Quando as folhas caem as glândulas que sobram ficam brancas ou amarronzadas (SANTOS, 2016). As glândulas vegetais da *H. obovatus* secretam uma substância leitosa (látex), que apresenta a forma pegajosa, viscosa, brilhosa, recobre as gemas e tem coloração amarelada e marrom. Estas glândulas são encontradas na face adaxial dos pecíolos (LEITE, 2012).

Suas flores (Figura 1 e 2) são sésseis, hermafroditas, actinomorfas e pentâmeras apresentando o centro com cor amarela e as laterais na cor branca. O fruto é do tipo fóliculo, cilíndrico, ligeiramente arqueado, em forma de chifre, polispérmico (CARMO, 2005).

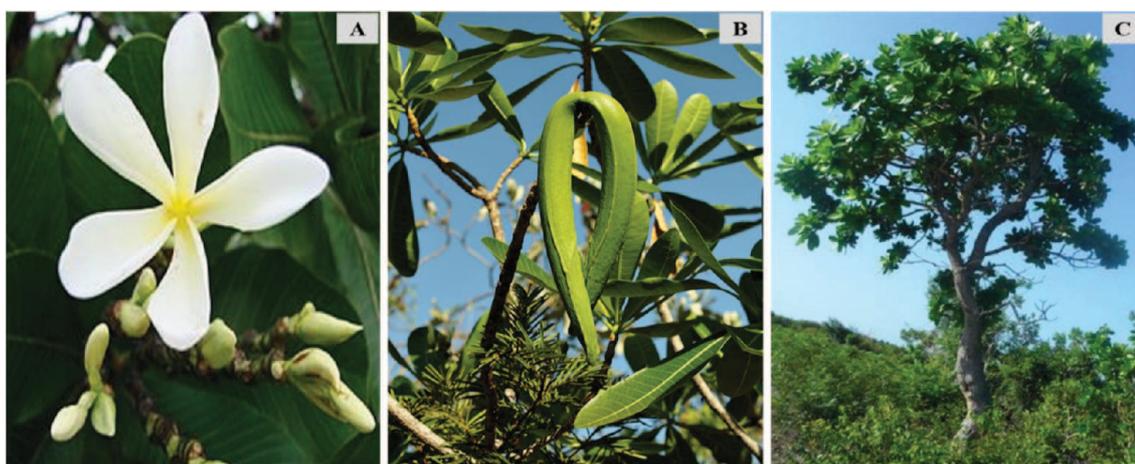


Figura 1. Morfologia da flor e folha de *H. obovatus*: A) Flor inserida na porção terminal de ramo, B) fruto em forma de chifre, C) árvore de médio porte do gênero *Himatanthus*. Imagem disponível em: < <http://www.plantaslatificiferas.ufc.br/photomadness/gallery1.html> >. Acesso em: 17 fev 2017.

Durante os meses de dezembro e de janeiro a agosto ocorre a floração da Tiborna e de outras espécies do cerrado. Possui uma deciduidade foliar semidecidual e as traças são responsáveis pelas guildas de polinização (BORGES, 2016).

Na medicina popular é feito o chá com as folhas e as raízes usado como depurativo e em úlceras estomacais e hormonal (COELHO, 2009). O látex é usado nas “garrafadas” ou com algumas gotas do látex na água e por infusão, para tratar úlceras estomacais e puro para cicatrização de feridas (SOUZA, 2016).

Foi identificado em suas folhas e raízes (Figura 2) estruturas isoladas da espécie *H. obovatus* em sua estrutura química (presente na família Apocynaceae) (LIMA, 2016).

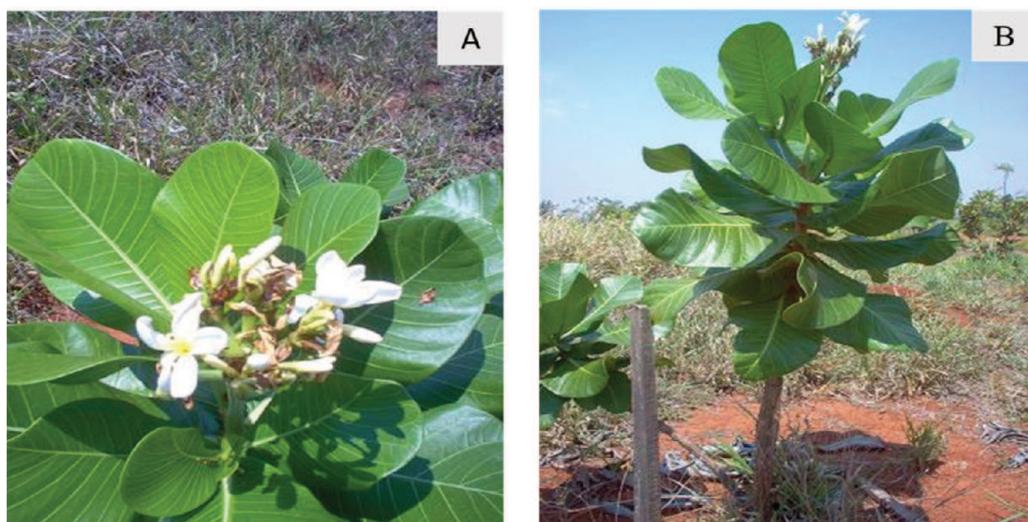


Figura 2. *Himatanthus obovatus*: A) visão geral da flor, B) árvore - primeira floração.

Imagem disponível em:

< <http://www.iesambi.org.br/campoavancado.htm> >. Acesso em: 14 fev. 2017.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar as atividades angiogênica / antiangiogênica e mutagênica / antimutagênica do látex de *H. obovatus*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade angiogênica/antiangiogênica do látex de *H. obovatus* mediante realização de testes laboratoriais “*in vivo*”, utilizando como modelo experimental a membrana corioalantóide do ovo embrionado de galinha (MCA).
- Avaliar o potencial mutagênico/antimutagênico do látex de *H. obovatus* pelo teste de mutagenicidade e através do tratamento simultâneo do látex da planta e substância sabidamente mutagênica a Ázida sódica para a cepa TA100 com a *Salmonella typhimurium* (teste de Ames).
- Caracterização físico-química do látex de *H. obovatus*, por meio da análise elementar, determinação dos grupos funcionais e análises termogravimétricas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Látex do *Himatanthus obovatus*

O material foi coletado em área de cerrado no Brasil – Estado de Goiás no município de Marzagão, estado de Goiás – Brasil (Anexo 1). Localizada à 604 metros de altitude, latitude de 17° 58' 53", longitude de 48° 38' 53" e a 206,8 Km da capital do Estado de Goiás. A exsicata do material contendo caule, folhas e frutos foi depositada e registrada na Unidade de Conservação/PRPPG, no Herbário da Universidade Federal de Goiás – UFG, com o número de registro 49580.

Para a obtenção do látex, as folhas da Tiborna foram removidas diretamente da bainha, e posteriormente o látex colhido. Em seguida, o látex foi acondicionado diretamente em potes coletores, sem o uso de anticoagulante.

4.2 Teste da Angiogênese

4.2.1 Ovos embrionados de galinha

Foram analisadas 70 membranas corioanlantoide do ovo embrionado de galinha (*Gallus domesticus*). Os ovos foram obtidos da granja São Domingos, Setor Vale das Pombas da cidade de Aparecida de Goiânia – Goiás.

4.2.2 Substâncias utilizadas

- a) Controle inibidor. Solução de Dexametasona injetável, na concentração de 4mg/mL - Aché Laboratórios Farmacêuticos, Lote nº: 1510580, validade em setembro de 2017.
- b) Controle negativo: Água para Injeção, Samtec Biotecnologia Ltda, Lote: OUW, validade em outubro de 2017.
- c) Controle positivo: Regederm® - Pele Nova Biotecnologia, Lote nº: 00134061, validade em fevereiro de 2018.
- d) Cloreto de Sódio 0,9%, Samtec Biotecnologia Ltda, Lote: CDI, validade: dezembro de 2017.
- e) As soluções testes do látex de *H. obovatus* foram diluídas em água destilada com seguinte titulação 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20.

4.2.3 Procedimento experimental para avaliação “*in vivo*” da atividade angiogênica/antiangiogênica.

Os ovos embrionados de galinha foram incubados em estufa automática a temperatura de 37°C e com umidade entre 60 e 70%, durante os dezesseis dias de incubação. No quinto dia de incubação foi realizado, na casca do ovo, uma abertura circular, com auxílio da micro-retífica de Dremel. Este procedimento foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar, em ambiente previamente esterilizado com luz ultravioleta.

Após a realização da abertura da casca do ovo foi depositado uma gota (NaCl 0,9% p/v), expondo a MCA já vascularizada. A abertura foi vedada com fita adesiva e o ovo foi novamente incubado.

Ao final do 13º dia de incubação, discos de papel filtro, veiculando a solução do látex testada e com os controles (negativo, indutor, inibidor), foram depositados diretamente sobre a membrana. Todos os ovos voltaram para a incubação até o 16º dia, quando foram retirados.

Todas as MCAs foram fixadas com solução de formol (3,7 % v/v) por 5 minutos, cortadas detalhadamente e retiradas mantidas em placa de Petri com solução de formol a 10%. Em seguida, as fotografias foram obtidas por equipamento digital, em tamanho 640x480 pixels e formato de RGB 24 bits, padronizados com objetivo de analisar e quantificar a rede vascular (WILTING et al.,1992; BEIJNUM, 2008).

4.2.4 Análise histológica

Foram analisadas 35 MCAs sendo os grupos: controle positivo (Regederm), negativo (H₂O), inibidor (Dexametasona) e substância teste nas concentrações de 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20. Foi analisado 5 membranas em cada controle e tratamento. As MCAs do ovo de galinha com uma rede vascular neoformadas foram fixadas em solução de formaldeído a 10% e incluídas em bloco de parafina. Em seguida, os blocos foram cortados a 5 µm de espessura no micrótomo Spencer e corados com hematoxilina –eosina. O material foi analisado em microscópio da marca Nikon de luz comum em aumento de 10x e 20x. Analisou os seguintes parâmetros: quantidade de vasos sanguíneos, infiltrado celular, tamanho dos vasos sanguíneos e picnose celular. Cada parâmetro foi classificado pela intensidade. Os resultados foram classificados pela intensidade de cada parâmetro: ausente (0), discreto (1), moderado (2) e intenso (3) (RIBATTI et al., 1996, CARNEIRO, 2016).

O software AngioQuant versão 6.5 foi utilizado para mensurar o comprimento, calibre, número de junções e número de complexos dos vasos sanguíneos formados na membrana corioalantoide do ovo embrionado de galinha (NIEMISTÖ, 2005; REMA, 2012)

4.2.5 Análise dos resultados

Para a análise estatística dos dados foi utilizado o software BioEstat versão 5.3. Em cada grupo foram analisadas 70 membranas, sendo 10 de cada grupo. A diferença entre os controles e as diferentes concentrações pela análise de variância ANOVA – teste de Tukey. As diferenças entre os grupos (controles e teste) foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

4.3 Teste de Mutagenicidade de Ames em cepas de *Salmonella typhimurium*

4.3.1 Cepas bacterianas

Foi utilizada a cepa bacteriana de *Salmonella typhimurium*:

- TA-100 (mutações pontuais).

4.3.2. Soluções, Reagentes e meios de Cultura

Solução de sais de Vogel-Bonner

- Sulfato de magnésio P. A. (1 g), ácido cítrico monohidratado P.A. (10 g), fosfato de potássio dibásico P. A. (50 g), fosfato de sódio e amônio P. A. (17,5 g), água destilada (65 mL).

Solução de Dextrose 40%

- Dextrose P. A. (60g), água destilada (90 mL).

Meio Mínimo Glicosado (placa-teste)

- Ágar (15 g), solução de sais de Vogel-Bonner (20 mL), solução de dextrose (50 mL), água destilada (930 mL).

Para a preparação das placas-teste contendo o Meio Mínimo Glicosado, foram distribuídos 25 mL do meio de cultura em placas de Petri as quais permaneceram por 12 horas em estufa a 37°C.

Soluções de histidina e biotina

- Histidina (50 mg), água destilada (10 mL).
- Biotina (18 mg), água destilada (125 mL).

Placa Máster

- Ágar (7,5 g), água destilada (500 mL), solução de sais de Vogel-Bonner (10 mL), solução de dextrose (25 mL), solução de biotina (3 mL), solução de histidina (5 mL).

Traços de histidina e biotina

- Biotina (30,9 mg), L-Histidina (24 mg), água destilada (250 mL).

Ágar de superfície (top-ágar)

- Ágar Bacto (0,6 g), cloreto de Sódio (NaCl) (0,5 g), solução de histidina/biotina (10 mL), água destilada (250 mL).

Caldo Nutritivo

- Caldo Nutritivo (2,5 g), água destilada (100 mL).

Controle Positivo:

- TA100 - Azida sódica (0,005 µg), água destilada (1mL).

Controle Negativo:

- TA 100 - Água destilada estéril

4.3.3 Procedimento Experimental do Teste de Ames

A estirpe de *Salmonella typhimurium* TA100 foi incubada em caldo nutritivo, a 37°C, sob agitação constante durante 12 horas, atingindo a fase estacionária de crescimento. Na avaliação da atividade mutagênica, as alíquotas das culturas “pernoite” de *S. typhimurium* de TA-100 foram incubadas com diferentes concentrações de 1:2, 1:5 e 1:10 do látex de *H. obovatus*, durante 25 minutos, em tubos em triplicata com agitação constante. Na avaliação da antimutagenicidade, o controle positivo (1,5 µg de azida sódica) foi coadministrado com as diferentes concentrações 1:2, 1:5 e 1:10 do látex de *H. obovatus*. Após a incubação, foi adicionado ágar glicosado liquefeito à temperatura de 45°C, contendo solução de histidina/biotina (0,5 mM). O conteúdo foi transferido para as placas de Petri, em triplicata, contendo meio MEVB sólido (meio mínimo glicosado), em seguida foram incubadas a 37°C, durante 48 horas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD). Após este período, foram contados os números de colônias revertentes prototróficas para histidina, considerando-se a média aritmética dos resultados entre as placas, apresentados pela média do número de revertentes prototróficas de cada experimento independente realizado em triplicata (MARON & AMES, 1983).

4.3.4 Análise dos resultados

Para avaliação da mutagenicidade após a contagem do número de revertentes, foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose utilizada. Para calcular a RM, utilizou-se a equação:

$$RM = \frac{\text{média do n}^\circ \text{ de revertentes por placa teste (espontâneos + induzidos)}}{\text{média do n}^\circ \text{ de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos)}}$$

Considera-se como resultado positivo para mutagenicidade quando o número de colônias revertentes nas placas teste for igual ou superior ao dobro do número de colônias revertentes espontâneas do controle negativo (MARON & AMES, 1983). Os resultados foram avaliados pelo teste estatístico ANOVA e *post hoc* Tukey e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Para avaliação da antimutagenicidade, foi avaliada pelo teste estatístico ANOVA *post hoc* Tukey. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo quando comparado ao controle

positivo. A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS. A porcentagem de inibição da mutagenicidade (PI) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$PI(\%) = \left[1 - \left(\frac{n. de revertentes na placa teste - RE}{n. de revertentes na placa do controle positivo - RE} \right) \right] \times 100$$

Placa teste: placas incubadas com mutágeno e composto.

Placa do controle positivo: placa incubada somente com o mutágeno.

RE: revertentes espontâneos (cepas testes incubadas na ausência de composto e mutágeno).

4.4. Análise físico-química

4.4.1 Análise elementar

A determinação empírica de carbono, hidrogênio e nitrogênio (CHN) nas amostras foi realizada no equipamento Analyser Organic Elementar, Flash 2000, Thermo Scientific. A amostra é submetida à degradação térmica em atmosfera de oxigênio e os gases provenientes são analisados por condutividade térmica (ARAGÃO, 2006; PEREIRA, 2011).

4.4.2 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (IV-FT)

A determinação dos grupos funcionais da amostra foi realizada pela espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier. A análise foi realizada no equipamento da marca Perkin Elmer, modelo Spectrum 400 TF-IR, no modo de Refletância Total Atenuada, o espectro foi adquirido na faixa de 400 a 4000 cm^{-1} .

4.4.3 Análises termogravimétricas (TG)

As análises termogravimétricas foram realizadas em um equipamento de termogravimetria da marca Shimadzu modelo DTG-60H. As amostras foram aquecidas da temperatura ambiente até 800 $^{\circ}\text{C}$ a uma taxa de 10 $^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$, com fluxo de nitrogênio de 50 $\text{mL}.\text{min}^{-1}$, utilizando-se um cadinho de alumina.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade angiogênica/antiangiogênica do látex extraído de *H. obovatus* pelo ensaio em MCA.

Foram analisadas 10 MCAs por grupo, a atividade angiogênica do látex extraído do *H. obovatus* nas concentrações de 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20 na MCA. Utilizou-se como controle negativo (água destilada), controle inibidor (dexametasona) e controle positivo (Regederm® – Pele Nova Biotecnologia). As redes vasculares das membranas foram analisadas após 72 horas de tratamento dos controles e teste (MELO-REIS et al., 2010; CHAVES et al., 2016). As médias e os desvios padrões estão apresentados na tabela 1 e figuras 3 e 4.

Tabela 1. Médias e desvios padrões obtidos na mensuração do comprimento, calibre, números de junções e complexos dos vasos sanguíneos.

Grupos	Comprimento	Calibre	Número de junções	Nº de Complexos
Controle Positivo (Regederm®) ^a	4545,9 ± 1606,1	17064,7 ± 9239,5	96,8 ± 71,9	35 ± 4,9
Controle Inibidor (Dexametasona) ^b	3773,3 ± 2106,2	21198,6 ± 14156,6	61,4 ± 49,5	12,9 ± 4,2
Controle Negativo (H ₂ O) ^c	3347,9 ± 751,4	14492,1 ± 5220,7	65,7 ± 21,7	22,5 ± 5,7
Látex 1:2	5119,8 ± 1517,7 ^c	20160,4 ± 7381,9 ^a	137,4 ± 67,7 ^{b,c}	33,7 ± 7,3 ^{b,c}
Látex 1:5	6182 ± 1401,8 ^{a,b,c}	27078,3 ± 14620,8 ^{a,c}	152 ± 77,1 ^{b,c}	25,7 ± 6, ^{a,b}
Látex 1:10	4107,7 ± 2392,7	37617,8 ± 36779,8	104,4 ± 88,4	26,3 ± 10,7 ^a
Látex 1:20	5889,4 ± 953,3 ^{a,b,c}	23823 ± 4117,5 ^c	149,3 ± 48,7 ^{b,c}	27 ± 6,6 ^{b,c}

ANOVA, Tukey

^a p<0,05 quando comparado com controle positivo;

^b p<0,05 quando comparado ao inibidor;

^c p<0,05 quando comparado ao controle negativo.

Os resultados do comprimento dos vasos do látex de *H. obovatus* nas concentrações de 1:5 e 1:20 apresentaram significativamente maior quando comparado ao controle positivo (p<0,05). As concentrações 1:5 e 1:20 do látex de *H. obovatus* apresentou o comprimento dos vasos significativamente maior quando comparado ao controle inibidor (p<0,05). Quando comparado ao controle negativo o comprimento dos vasos do látex de *H. obovatus* nas

concentrações de 1:2, 1:5 e 1:20 apresentaram significativamente maior em relação ao controle negativo ($p < 0,05$).

O calibre dos vasos do látex de *H. obovatus* nas concentrações de 1:2 e 1:5 apontou resultado significativamente maior quando comparado ao controle positivo ($p < 0,05$). Os resultados das concentrações 1:5 e 1:20 do látex de *H. obovatus* apresentaram significativamente maior quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$).

O número de junções das MCAs tratadas com o látex de *H. obovatus* nas concentrações de 1:2, 1:5 e 1:20 do látex de *H. obovatus* apresentaram diferença significativa quando comparados controle negativo e controle inibidor ($p < 0,05$).

O resultado do número de complexos encontrados no látex de *H. obovatus* na concentração 1:5 demonstrou significativamente maior ao controle positivo e controle inibidor ($p < 0,05$). A concentração de 1:10 do látex de *H. obovatus* demonstrou significativamente maior ao controle positivo ($p < 0,05$). As concentrações 1:2 e 1:20 do látex de *H. obovatus* apresentaram significativamente maior ao controle inibidor e controle negativo ($p < 0,05$).

Os resultados da quantificação estão representados no gráfico 3 e figura 4.

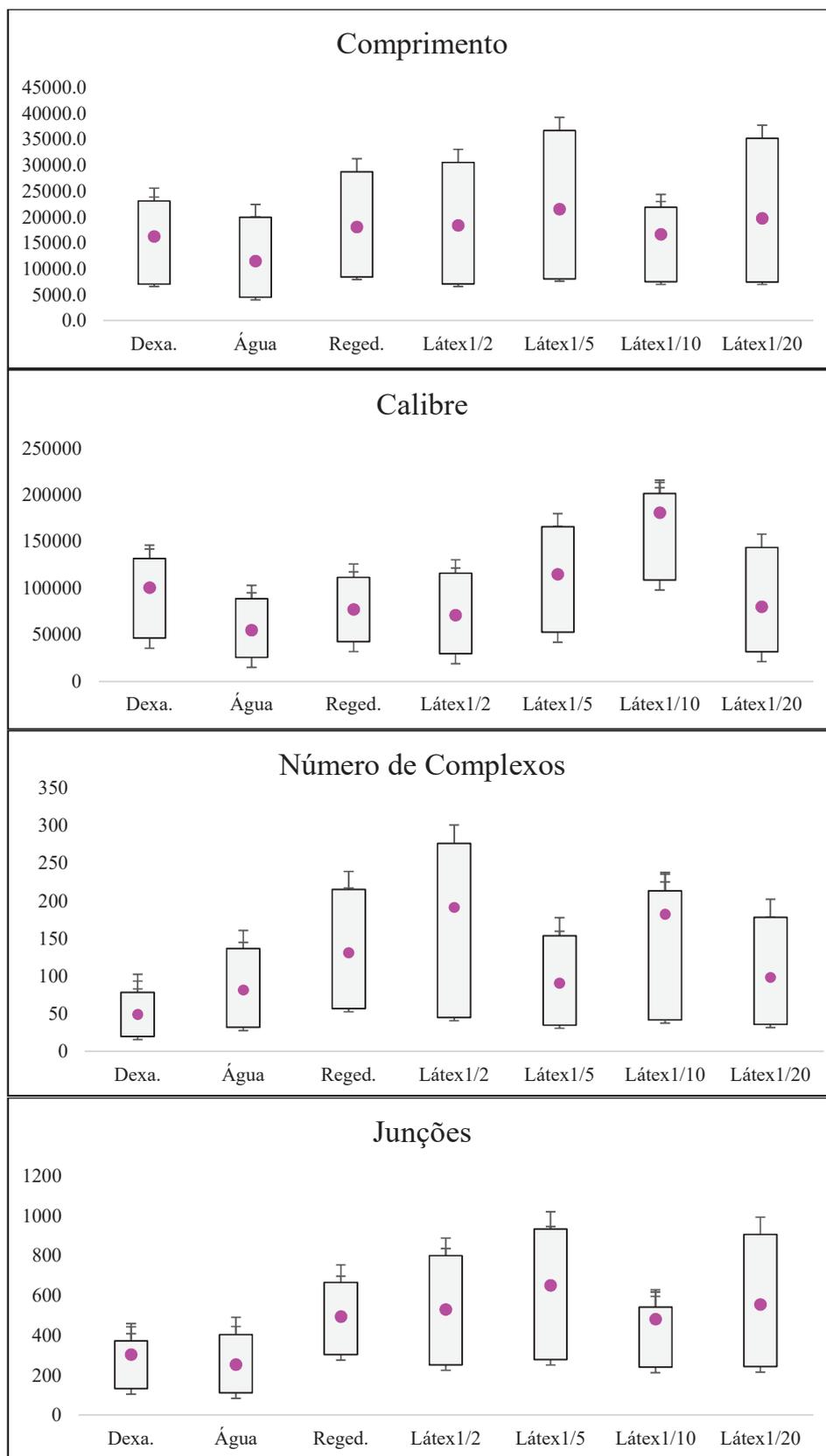


Figura 3. Gráfico Box Plot dos valores do comprimento, calibre, junções e número de complexos das MCAs obtidas após tratamento com o látex de *H. obovatus* e controles.

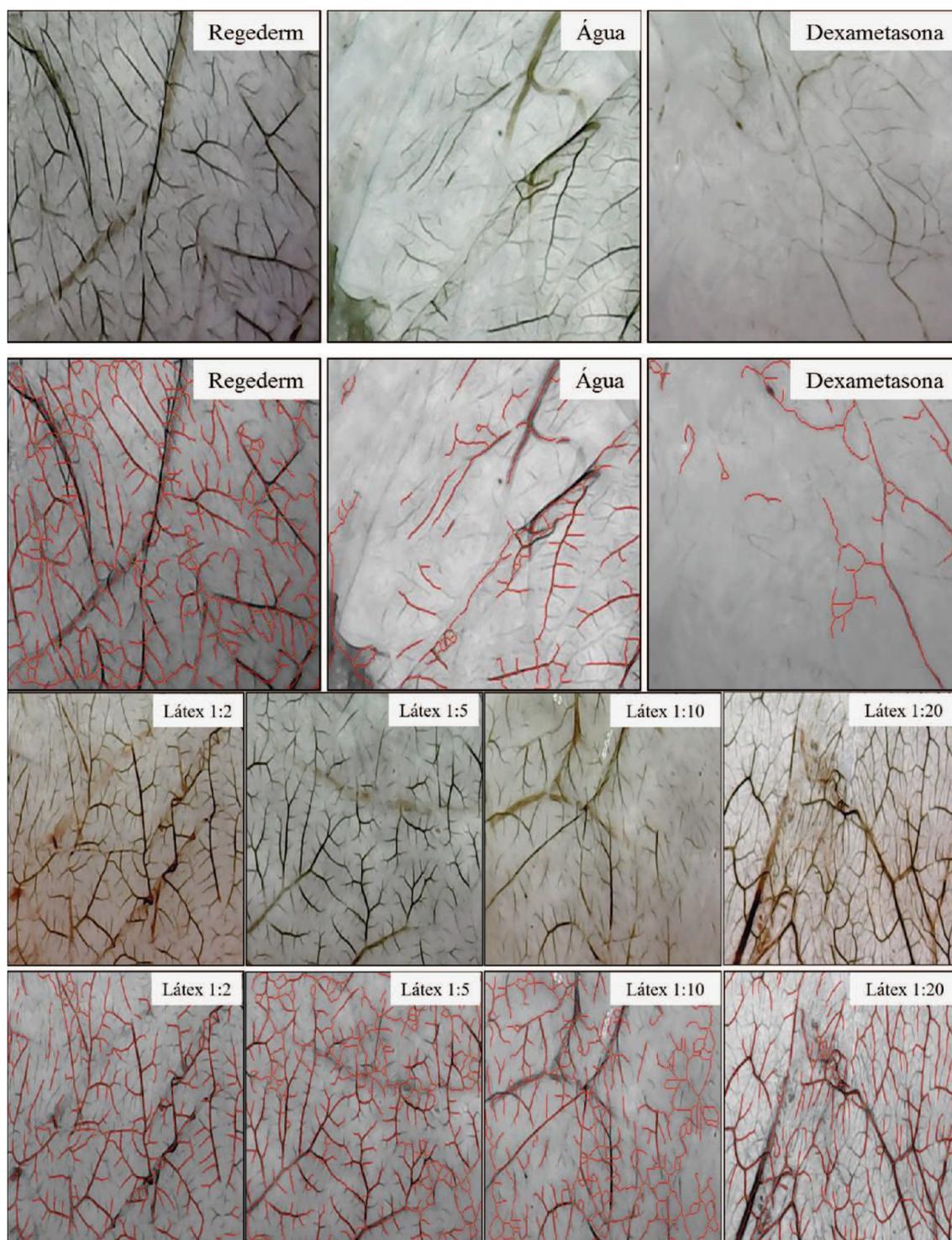


Figura 4. Imagens representativas da rede vascular formada na região Membrana corioalantóide (MCA) após tratamento com o látex de *H. obovatus*. As imagens de MCA no software Angioquant (segunda linha das imagens).

5.2 Análise histológica da membrana corioalantóide

Na análise histológica das membranas obtidas no ensaio da angiogênese, foram considerados para avaliação, quatro parâmetros: presença de vasos sanguíneos, infiltrado celular, picnose celular e tamanho dos vasos. Os dados estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 - Análise histológica das MCAs apresentando Média \pm desvio padrão (DP) dos parâmetros histológicos classificados em uma escala de 0-3.

Tratamento μ L	Vasos sanguíneos	Infiltrado Celular	Picnose Celular	Tamanho dos Vasos
Controle Positivo (Regederm®) ^a	2,8 \pm 0,5	3,0 \pm 0	3,0 \pm 0	2,8 \pm 0,5
Controle Inibidor (Dexametasona) ^b	1,6 \pm 0,5	1,2 \pm 0,4	1,4 \pm 0,5	1,2 \pm 0,4
Controle Negativo (H ₂ O) ^c	2,0 \pm 0	1,8 \pm 0,4	1,4 \pm 0,5	2,0 \pm 0
Látex 1:2	2,6 \pm 0,5 ^{b,c}	3,0 \pm 0 ^{b,c}	2,6 \pm 0,5 ^{b,c}	2,6 \pm 0,5 ^{b,c}
Látex 1:5	2,5 \pm 0,6 ^{b,c}	2,5 \pm 0 ^{b,c}	2,8 \pm 0,5 ^{b,c}	2,0 \pm 0 ^b
Látex 1:10	3,0 \pm 0 ^{b,c}	2,8 \pm 0,4 ^{b,c}	2,6 \pm 0,5 ^{b,c}	2,8 \pm 0,4 ^{b,c}
Látex 1:20	2,8 \pm 0,5 ^{b,c}	3,0 \pm 0 ^{b,c}	3,0 \pm 0 ^{b,c}	2,8 \pm 0,5 ^{b,c}

ANOVA, Tukey

^a p<0,05 quando comparado com controle positivo ;

^b p<0,05 quando comparado ao inibidor;

^c p<0,05 quando comparado controle negativo.

Os resultados demonstraram um aumento de vasos sanguíneos em todas as concentrações do látex de *H. obovatus* quando comparado ao controle negativo e controle inibidor (p<0,05). A presença de infiltrado celular nas MCAs em todas as concentrações do látex de *H. obovatus* foi significativamente maior em comparação controle negativo e controle inibidor (p<0,05). Também observou-se a presença picnose celular nos grupos testes demonstrando significativamente maior aos valores encontrados no controle inibidor e controle negativo (p<0,05). O tamanho dos vasos do látex de *H. obovatus* nas concentrações 1:2, 1:10 e 1:20 apresentaram significativamente maior ao controle negativo e controle inibidor (p<0,05) e na concentração 1:5 do látex de *H. obovatus* apresentou significativamente maior quando comparado ao controle inibidor (p<0,05). As imagens demonstram a análise da Fotomicrografia na figura 5 e 6.

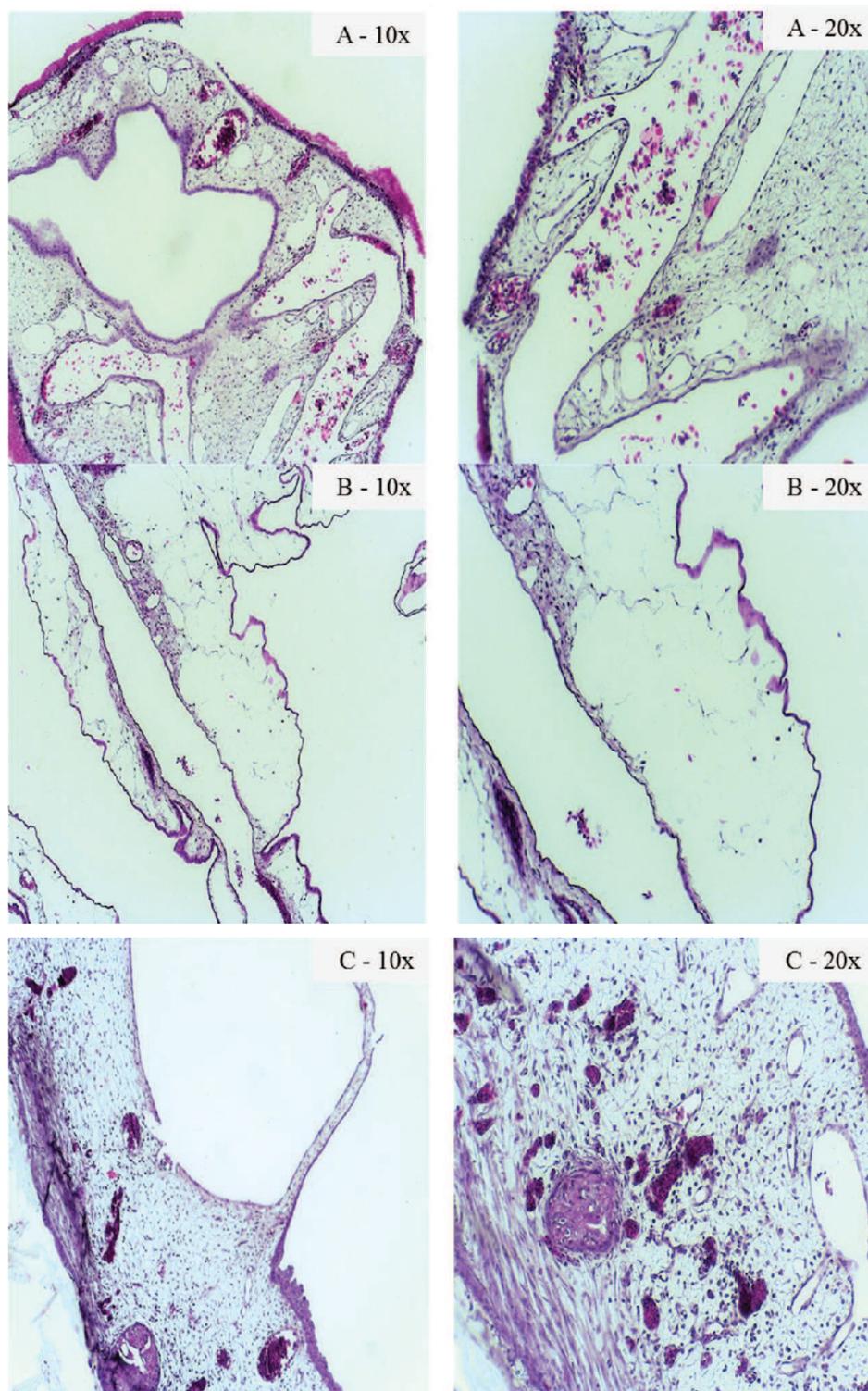


Figura 5. Fotomicrografia dos cortes histológicos da MCA. Foram analisadas cinco membranas de cada grupo coradas com hematoxilina-eosina (HE), (A) controle positivo (Regederm®), (B) controle inibidor (Dexametasona), (C) controle negativo (Água).

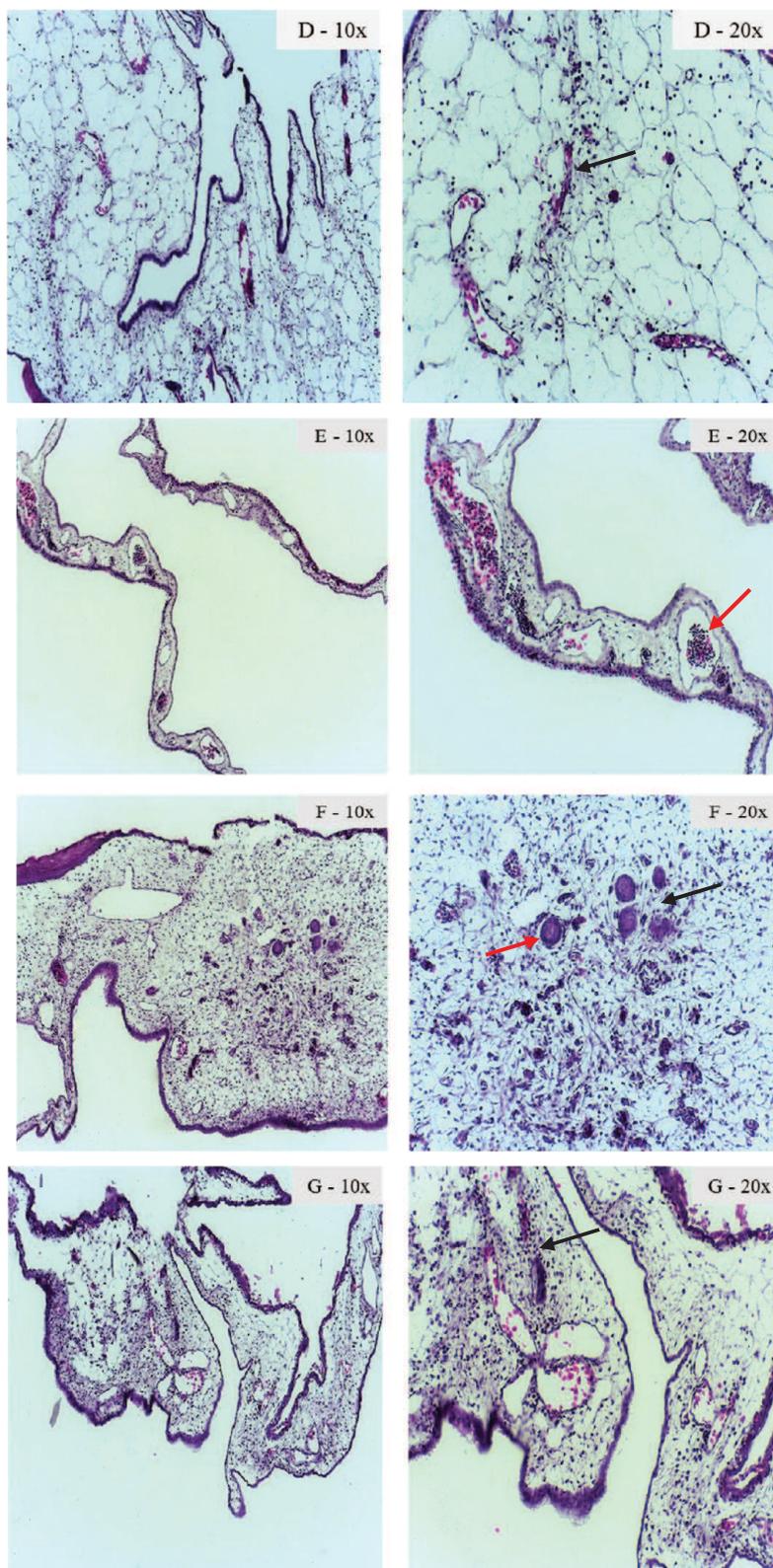


Figura 6. Fotomicrografia dos cortes histológicos da MCA. Foram analisadas cinco membranas de cada grupo coradas com hematoxilina-eosina (HE), (D) látex concentração 1:2, (E) látex concentração 1:5, (F) látex concentração 1:10, (G) látex concentração 1:20. As setas pretas indica a presença de elementos inflamatórios e as setas vermelhas indica a presença de vasos sanguíneos.

5.3 Teste de mutagenicidade de Ames

Tabela 3. A média e o desvio padrão (DP) obtidos de três experimentos independentes em triplicata das colônias revertentes de histidina, índice mutagênico (MI) e percentagem de inibição (PI) de mutagenicidade da estirpe do teste de *S. typhimurium* - TA100. Tratamento realizado com doses do látex de *H. obovatus*.

Tratamento	Mutagenicidade		Antimutagenicidade	
	TA 100		TA 100	
	Média ± DP	RM	Média ± DP	PI (%)
Controle Negativo ¹	28,7 ± 11,7	1,0	56,3 ± 62,9	–
Controle Positivo ²	1069,3 ± 41,5	37,3	1448,7 ± 644,2	–
Látex – 1:2	428 ± 11,5 ^A	14,9	781,3 ± 223,8 ^D	46,1
Látex – 1:5	275,3 ± 202,2 ^A	9,6	653,3 ± 198,5 ^D	54,9
Látex – 1:10	120,3 ± 113,3 ^A	4,2	583 ± 237,2 ^D	59,8

¹10 µl de água destilada; ² 1,5 µg de Azida sódica para TA100.

Mutagenicidade: ^A Existe diferença significativa quando comparado ao controle negativo ($p < 0,05$) e

^B Não existe diferença significativa quando comparado ao controle negativo ($p > 0,05$).

Antimutagenicidade: ^C Existe diferença significativa quando comparado ao controle positivo ($p < 0,05$) e

^D Não existe diferença significativa quando comparado ao controle positivo ($p > 0,05$).

Análise estatística: teste de ANOVA post hoc Tukey.

A Tabela 3 mostra os resultados da avaliação mutagênica e antimutagênica do látex de *H. obovatus* no teste de Ames. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Na avaliação da mutagenicidade, as concentrações do látex (1:2, 1:5 e 1:10 µL/placa) apresentaram um aumento no número de revertentes prototróficas para a cepa testada TA100. Os resultados apontaram uma diferença significativa entre o controle negativo e as diferentes concentrações do látex, pelo teste ANOVA *post hoc* Tukey ($p < 0,05$). Em todas as concentrações do látex observou-se uma $RM \geq 2$. O maior valor de RM foi obtido na concentração 1:2 µL/placa, na qual observou uma $RM = 14,9$. O látex de *H. obovatus* apresentou efeito mutagênico em todas as concentrações testadas.

A análise antimutagênica do látex de *H. obovatus* mostrou que todas as concentrações (1:2, 1:5 e 1:10 µg/placa) co-tratadas com azida sódica causou uma diminuição do número de revertentes prototróficas em comparação com o controle positivo. No entanto, esta diminuição não indicou uma diferença significativa entre o controle positivo e as diferentes concentrações do látex ($p > 0,05$). A maior porcentagem de inibição de mutagenicidade (PI) foi observada na

concentração de 1:10 μL /placa do látex de *H. obovatus*, onde observou-se uma PI = 59,8%. Estes resultados sugerem um efeito antimutagênico do látex de *H. obovatus*.

5.4 Análise físico-química

As análises foram realizadas em duas amostras distintas: i) Látex de *H. obovatus* estabilizado com amônia (Lt); ii) Biomembrana de mangabeira (Bm). A biomembrana de mangabeira foi utilizado como controle, para comparar com o látex de *H. obovatus*.

Na análise elementar os resultados obtidos para a análise elementar das amostras estão representadas na tabela 4:

Tabela 4: Resultado da determinação empírica de Carbono, Hidrogênio e Nitrogênio para as amostras do látex de de *H. obovatus* e da biomembrana de mangabeira (Bm).

Amostras	Nitrogênio (%)	Hidrogênio (%)	Carbono (%)	Outros (%)
Látex <i>H. obovatus</i> (Lt)	1	9	64	26
Látex Mangabeira (Bm)*	4	8	53	35

Valores representam a média das análises em triplicata. * Dados obtidos de Magno, 2013.

A composição percentual de hidrogênio em Lt e Bm foi bastante similar, 9 e 8%, respectivamente. A relação da composição percentual da parte lipofílica e hidrofílica, dada pela razão entre %C e %N foi maior para Lt que Bm, 64 contra 13,25. Isto pode indicar que Lt tenha caráter mais lipofílico e Bm hidrofílico.

Foi possível verificar no espectro de IV-FT, mostrado na figura 7, que as duas amostras possuem espectro bastante similares. As bandas referentes a 3444, 1642 e 660 referem-se à água. As bandas entre 2960 e 2859 cm^{-1} são atribuídas ao estiramento da ligação C-H de carbono sp^3 . As bandas em 1448 cm^{-1} e 1375 cm^{-1} são atribuídas aos dobramentos das ligações CH_2 e CH_3 , respectivamente.

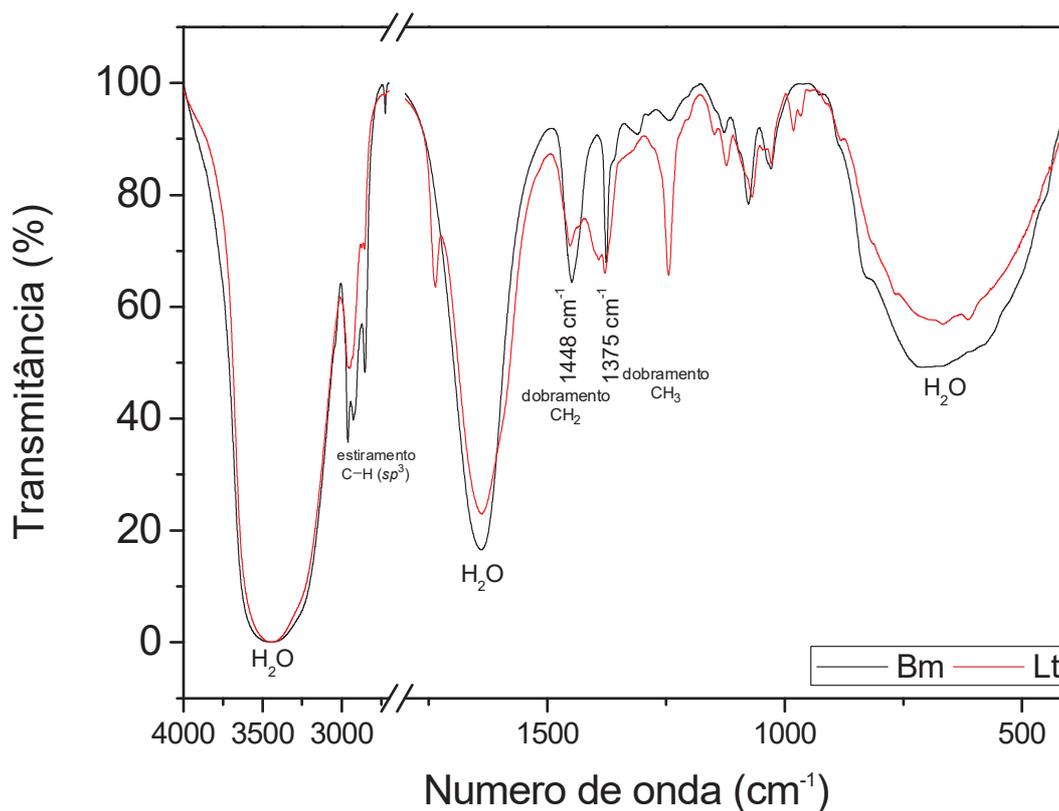


Figura 7: Espectro de IV-FT para as amostras de Bm e Lt.

Nas curvas TGA apresentadas na Figura 8, observamos um padrão muito similar entre as amostras analisadas, que podem ser separadas em três etapas: uma primeira com uma perda significativa de massa de cerca que ocorre abaixo de 150°C e que corresponde à desidratação inicial da amostra. Além disso, também podem estar associadas à liberação de subprodutos de baixa estabilidade térmica presentes no látex, como proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. A segunda etapa, de 150 a 380°C que pode estar associada à formação de novos produtos (aldeídos e cetonas). Na figura 8 na terceira etapa onde praticamente toda a massa é consumida que se encerra por volta de 470°C e pode estar associadas à degradação das cadeias poliméricas mais estáveis (MAGNO 2013).

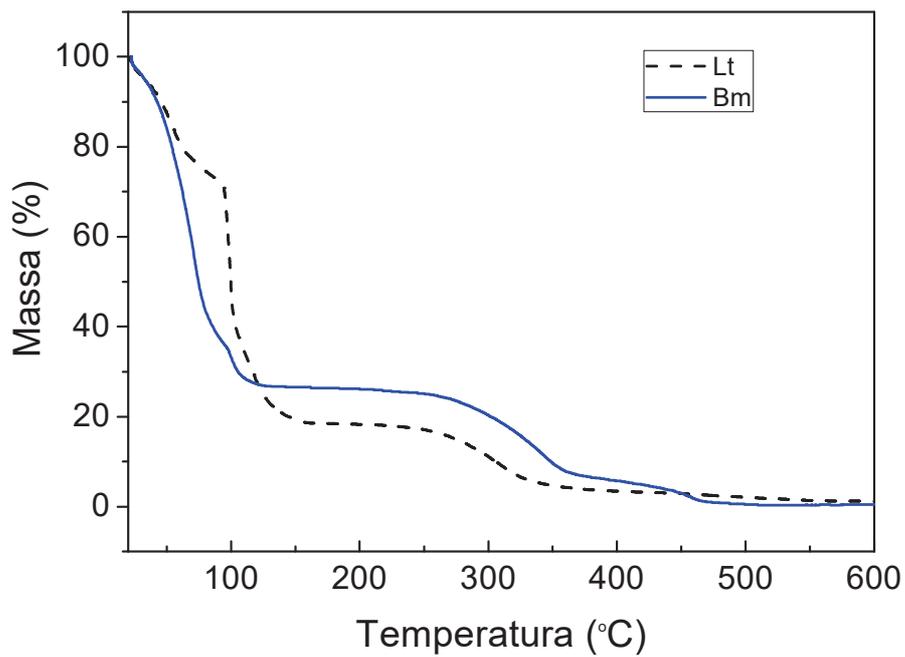


Figura 8: Curvas TGA das amostras analisadas.

Desta forma, comparando os resultados das duas amostras, percebe-se grande semelhança química e estrutural entre os compostos analisados e que conseqüentemente sugerem a possibilidade de terem propriedades e resposta biológica semelhantes.

6 DISCUSSÃO

Entre as inúmeras espécies de plantas de uso medicinal no Brasil, destacam-se as plantas lactíferas. A espécie *H. obovatus* ou Tiborna como é conhecida pela população local desperta o interesse de estudo desta planta para confirmar as propriedades terapêuticas e aplicações na medicina popular. Sendo manipulado pela população sem comprovação científica. O crescimento da procura popular pelo látex de *H. obovatus*, em toda a região, é devido principalmente ao interesse pela utilização do látex como cicatrizante. Este estudo avaliou os efeitos das atividades angiogênica/antiangiogênica e mutagênica/antimutagênica do látex de *H. obovatus*.

Na avaliação da atividade angiogênica o comprimento dos vasos, calibre, junção e número de complexos da MCA. Ao analisar o comprimento dos vasos os resultados do látex de *H. obovatus* nas concentrações de 1:5 e 1:20 apresentaram resultados relevantes em comparação com o controle positivo. As concentrações 1:2, 1:10 do látex de *H. obovatus* apresentou o comprimento maior ao controle inibidor e a concentração 1:5 ao controle negativo. Demonstrando o potencial do látex na indução da neoangiogênese como observado no aumento do comprimento dos vasos. Estes vasos sanguíneos imaturos são provenientes do recrutamento de células murais que ficam próximas da membrana basal, contribuindo para o aumento do tamanho dos vasos (REMA, 2012).

O calibre dos vasos sanguíneos e o número de junções do látex de *H. obovatus* nas concentrações de 1:2, 1:5 e 1:20 apresentou atividade angiogênica. As junções demonstra a formação de cada ramo em menor calibre e a formação de novos vasos. O calibre e as junções dos vasos assegura uma circulação colateral, para manter o fluxo sanguíneo entre os vasos garantindo a troca de substâncias com os tecidos (GUYTON, 2006).

O resultado do número de complexos que representa a média de cada vaso sanguíneo quantificado pelo software Angioquant, encontrou em todas concentrações no látex *H. obovatus* a indução da angiogênese na MCA. A formação de novos vasos ao atingir os capilares conduz em maior proporção nutrientes e de absorção na troca de substâncias (REMA, 2012).

Ao analisar a histologia das MCAs, no ensaio de angiogênese também avaliou os vasos sanguíneos, picnose celular, infiltrado celular e o tamanho dos vasos perante os resultados também apresentaram atividade angiogênica, caracterizando a presença de elementos inflamatórios. A literatura ressalta a relevância de uma análise cuidadosa da histologia da MCA, ao identificar nos resultados a presença de um infiltrado perivascular junto com uma reação hiperplásica (RIBATTI, 2006).

Um importante fator que permite explicar a angiogênese detectada neste estudo está na composição do látex de *H. obovatus*. A presença de iridóides, ésteres, ligninas, glucitol e terpenos já foram detectados na espécie de *H. obovatus* (LIMA, 2005). Os componentes de látex como os iridóides (catalpol), por exemplo, foram descritos ao apresentar no processo inflamatório os iridóides faz uma interconexão que envolve o aumento da migração e da proliferação de células inflamatórias na ação regulatória de citocinas e de fatores de crescimento e ação hepatoprotetora contra agentes tóxicos (VALE, 2014).

Estudos farmacológicos demonstraram que estas substâncias são responsáveis pela atividade analgésica, baixa toxicidade reprodutiva e teratogênica em animais e efeito cicatrizante (PAZ, 2013; VALE, 2014). Foi identificado na casca, folhas e no látex de *H. obovatus* os triterpenos β -amirina e acetato de lupeol em sua casca, na folha identificaram a presença de β -amirina e acetato de lupeol. Em suas folhas encontraram-se flavonoides a isoquercitrina. Os iridóides (casca) plumierídeo (MORGAGAS, 2006).

O plumierídeo, o iridóide e o lupeol apresentam um papel fundamental no processo anti-inflamatório, desencadeando o recrutamento de leucócitos para o local da inflamação e acelerando o processo de reparação na cicatrização (SALEEM, 2009). Os iridóides estão presentes em uma quantidade considerável de remédios populares como: sedativos, febrífugos, cicatrizantes e hipotensivos. Confirmando o uso pela população para os mesmos fins terapêuticos na medicina popular (MORAGAS, 2006).

Estudos apontam que compostos triterpenos apresentam importantes propriedades biológicas uma vez que atuam na inibição da enzima COX-2 a qual possui um papel regulatório no processo de angiogênese por meio da indução do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF), assim essa proteína vai estimular a formação de novos vasos sanguíneos (GRUDZINSKI et al., 2006; PARENTE, 2012).

Neste sentido, infere-se que o látex de *H. obovatus* tem envolvimento com a atividade angiogênica uma vez que seus compostos são excelentes mediadores pró-inflamatório, estimulando de modo rápido a produção de fatores de crescimento, além de promoverem a neovascularização (LIMA, 2005; PARENTE, 2012)

Em relação à atividade mutagênica do látex de *H. obovatus*, foi possível verificar neste estudo que o mesmo apresenta efeito mutagênico em cepa de *S. typhimurium* nas concentrações de 1:2, 1:5 e 1:10.

Paz et al., (2013) detectaram que o látex de *Himatanthus sucuuba*, apresenta atividade mutagênica através dos testes *Allium cepa* e Cometa nas concentrações de 2g/100mL e

3g/100mL. Além disso, este látex possui significativa mutagenicidade pela presença de micronúcleos e aberrações cromossômicas em linfócitos humanos nestas mesmas doses.

Segundo Wood et al., (2001), o látex do gênero *Himatanthus* apresenta uma lactona, denominada iridoide plumierídeo, a qual apresenta potencial efeito lesivo ao DNA, além de inibir em até 50% o crescimento de células neoplásicas durante a fase G1 (WOOD et al., 2001; OLIVEIRA, 2013).

O plumierídeo possui propriedades inibitória de crescimento de plantas e potencial antifúngico e o plumierídeo iridóides é considerada substância ativa do látex de *H. obovatus* em sua estrutura possui esterilização da unidade glicosídica, amidação e hidrólise de éster desencadeia a formação de derivados que demonstraram aumento da citotoxicidade (DOBHAL et al., 2004).

Em outro estudo, com o látex do *Himatanthus articulatus* também não ocorreu um aumento da frequência de danos ao DNA através dos ensaios cometa e micronúcleo em medula óssea de camundongos. O efeito protetor contra danos ao DNA induzidos pelo peróxido de hidrogênio é verificado no látex desta espécie (REBOUÇAS et al., 2013).

A análise antimutagênica do látex de *H. obovatus* mostrou que as concentrações 1:2 e 1:5 e 1:10 levou a uma diminuição do número de revertentes prototróficas, mas não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$). Entretanto levando em consideração a diminuição do número de revertentes e a PI obtida, podemos inferir que o látex de *H. obovatus* possui atividade antimutagênica. A composição fitoquímica do látex pode indicar o motivo deste efeito antimutagênico, a presença de terpenos e iridoídes tem sido relatada correm no látex de diferentes espécies *Himatanthus* (LIMA, 2005; OLIVEIRA, 2013).

Na análise físico-química o látex de *H. obovatus* apresentou uma composição percentual de nitrogênio, carbono e hidrogênio de 74% e restando 26% de outros componentes. O látex de *H. obovatus* expressou um perfil lipofílico. Esta análise físico-química por ser um teste rápido realiza uma análise rápida de substâncias ainda não estudada. Demonstrando uma grande importância para a análise e isolamento de princípios ativos presente no látex de *H. obovatus*, para um direcionamento na fabricação de novos medicamentos.

Na análise de TGA analisou o comportamento da amostra na presença de altas temperaturas e IV-FT as transições vibracionais entre as posições de energia das moléculas. Nos dois testes o látex de *H. obovatus* apresentou-se estável até atingir 470°C, onde toda a sua massa foi consumida e a presença de água nas bandas 3444, 1642 e 660. A similaridade com a biomembrana da mangabeira se deve por pertencerem a família Apocynaceae.

Portanto, o presente trabalho diante dos resultados sugere o uso tópico do látex de *H. obovatus* para cicatrização de feridas, ressaltando o uso em baixas concentrações devido a ação mutagênica.

7 CONCLUSÃO

Através dos métodos aplicados neste estudo, concluiu-se que o látex de *H. obovatus* apresentou atividade angiogênica em todas as concentrações.

O látex de *H. obovatus* apresentou ação mutagênica em todas as concentrações testadas com a cepa bacteriana mutante de *Salmonella typhimurium* TA100.

O látex de *H. obovatus* apresentou ação antimutagênica significativa, ao analisar as revertentes e a PI analisada nas concentrações, utilizadas quando em meio ao tratamento simultâneo com a substância mutagênica a Azida sódica na *Salmonella typhimurium* TA100.

Demonstrou caráter lipofílico na análise físico-química, com resultados semelhantes a biomembrana da mangabeira.

8 REFERÊNCIAS

ALLORGE, L., et al. Morphologie et chimiotaxomie des Apocynacées. Conclusions phylogenetiques et biogeographiques. **C. R. Biogeogr.** v. 57 (3), p. 112-126, 1981.

AMES, B. N. Oxidants, antioxidantes, and the degenerative disease of Aging. **Proc. Acad. Sci.** v. 90, p. 7915-7922, 1993.

ANDERSON, D., et al. The Effect Of Antioxidants On Bleomycin Treatment In Vitro And In Vivo Genotoxic Assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 329, p. 37-47, 1995.

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populonic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n. 3, p. 464-471, 2008.

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

ANTUNES, L. M. G.; TAKAHASHI, C. S. Olive oil protects against chromosomal aberrations induced by doxorubicin in wistar rat bone marrow cells. **Genetics and Molecular Biology**. v. 22, p. 225-227, 1999.

ARAGÃO, G. F. S. et al. Estudo do comportamento termo degradativo de *Aloe barbadensis* Mill (Liliaceae) e da *Conyza bonariensis* (Compositae). **Bio Farma: Revista Técnico - Científica de Farmácia: Bioquímica e Análises Clínicas e Toxicológicas**. v. 1, n. 3, p. 172-180, 2006.

ARAÚJO, L.A. et al. Angiogenic activity of sucupira (*Pterodon emarginatus*) oil. **Scientia Medica**, v. 25, n. 2, p. 1-7, 2015.

BEIJNUM J. R. V.; LINDEN E. V. D.; GRIFFIOEN, A. W. Angiogenic profiling and comparison of immortalized endothelial cells for functional genomics. **Experimental cell research**, v. 314, n. 2, p. 264-272, 2008.

BESSA, G. et al. Atividade angiogênica do látex da *Euphorbia tirucalli* Linnaeus 1753 (Plantae, Euphorbiaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v.75, n.3, p. 752-758, 2015.

BOREK, C.. Free radical processes in multistage carcinogenesis. **Free Radic. Res. Commun.** v. 12, p. 745–750, 1991.

BORGES, M. P. Caracterização dos grupos funcionais de espécies arbóreas do cerrado. Caracterização dos grupos funcionais de espécies arbóreas do cerrado. **Tese - Doutorado - UFSCar**, p. 107, 2016.

BRISKIN, D. P. Medicinal Plants and Phytomedicines. Linking Plant Biochemistry and Physiology to Human Health. **Plant Physiol.** v. 124, p. 507-514, 2000.

CARMO, E. J. S. et al. Caracterização anatômica de folhas adultas do *Himatanthus obovatus* (M.Arg.) Wood (Apocynaceae). In: **Seminário De Iniciação Científica (SIC-UEG)**, 2005.

CARNEIRO, C. C. et al. Chemopreventive effect and angiogenic activity of punicalagin isolated from leaves of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. **Toxicology and Applied Pharmacology.** v. 310, p. 1-8, 2016.

CASTRO, D.B.; et al. Atividades mutagênica e citotóxica do extrato de *Cochiospermum regium* Mart. (algodãozinho-do-campo) em camundongos. **Rev. Bras. OL. Méd., Botucatu.** v. 6(3), p. 15-19, 2004.

CHAVES, D.A, et al. Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** p. 18(2), p. 524-530, 2016.

CHAN E. W. C., et al. Review: Apocynaceae species with antiproliferative and/or antiplasmodial properties: a review of ten genera. **Journal of Integrative Medicine**. v. 14(4), p. 269-284, 2016.

CHUNG C. H., et al. Aggretin Venom Polypeptide as a Novel Anti-angiogenesis Agent by Targeting Integrin $\alpha 2\beta 1$. **Nature - Scientific Reports** 7, n. 43612, 2017.

COELHO, A. A. Efeito de extratos de plantas do Cerrado em *Dipetalogaster maxima* (Uhler) (Hemiptera, Reduviidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, p. 444-451, 2009.

ENDRESS, M.; BRUYNS P. V. A revised classification of the Apocynaceae s. l. **The Botanical Review**. New York, EUA. V. 66, n. 1, 2000.

FOLKMAN, J. A novel anti-vascular therapy for cancer. **Cancer Biol Ther**. v. 3(3), p. 338-9, 2004.

FUKUMASU, H. et al. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do cancer. **Revista Brasileira de Toxicologia** 21, n.2, 2008.

GALLO, M.; KOREN, G. Can herbal products be used safely during pregnancy? Focus on Echinacea. **Canadian Family Physician**, v.47, p.1727-8, 2001.

GLASER, V. Billion-dollar market blossoms as botanicals take root. **Nat. Biotechnol**. v. 17, p. 17-18, 1999.

GONZALEZ, R. P. et al. Método para o estudo in vivo da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 15, n. 2, 2000.

GONZALEZ, F. G.; BARROS S. B.; BACCHI E. M. Atividade Antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia Férra* mart. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: USP, v. 40, n. 1 p. 78-79, 2004.

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

GRUDZINSKI, M. et al. Expressão da COX-2 e CD105 no câncer de mama e sobrevida livre de doença. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 52, n. 4, 2006.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Tratado de Fisiologia Médica. **Elsevier**. Rio de Janeiro. Ed. 11, 2006.

HALBERSTEIN, R. Medicinal plants: Historical and cross cultural usage patterns. **Annu Epidemiol**. v. 15, p. 686 - 699, 2005.

HIRAMATSU, N. et al. Antimutagenicity of Japanese traditional herbs, gennoshoko, yomogi, senburi and iwa-tobacco. **BioFactors**. v. 22, p. 23-125, 2004.

IARC - International Agency for Research on Cancer. Monograph, Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. **Some Industrial Chemicals**, v. 77, p. 227-266, 2000.

IPNI. Plant Name Details. 2005. **The International Plant Names Index**. Disponível em: <<http://www.ipni.org/index.html>>. Acesso em: 13 de fev. 2017.

JONES, P.H. et al. Combination antiangiogenesis therapy with marimastat, captopril and fragmin in patients with advanced cancer. **British Journal of Cancer**. v. 5, n. 1, p. 30-6, 2004.

JUDD W. S., et al. Plant Systematics - a phylogenetic approach. **Sinauer Associates**. Inc., Sunderland. v. 576, 2002.

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

LEITE, R. G. Anatomia de coléteres e natureza química das secreções em quatro espécies de plantas nativas do Cerrado e seu papel ecológico em *Himatanthus obovatus* (Apocynaceae). **Repositório Institucional - UNB**. p. 1-100, 2012.

LEMES, S. R. et al. Avaliação das atividades angiogênica, genotóxica e antígenotóxica do óleo da Carapa guianensis (andiroba). **EVS - PUC GO**, 2014.

LIEKENS, S.; CLERCQ, E.; NEYTS, J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. **Biochemical pharmacology**. v. 61, n. 3, p. 253-270, 2001.

LIMA, V. B. Estudo fitoquímico do Himatanthus obovatus (Muell. Arg.). Woodson (Apocynaceae): Isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica. **Tese - Unicamp - Instituto de Química**. p. 1-194, 2005.

LIMA, V. B. Estudo fitoquímico do Himatanthus obovatus. **Unicamp - Instituto de Biologia**. p. 1-4, 2016.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**. v. 25, n. 3, 429-438, 2002.

MAGNO, L. N. Látex de mangabeira para aplicações biomédicas e tecnológicas. **Dissertação -Mestrado em Física - UFG**, 2013.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. **Mutation Research**. v. 113, p. 173-215, 1983.

MELO-REIS, P. R. et al. Angiogenic activity of Synadenium umbellatum Pax látex. **Brazilian Journal of Biology**. v. 70 (1), p.189-194, 2010.

_____.MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Brasília: **Ministério da Saúde - Brasil**, 2006.

MOHAN, N.; MELTZ, M. L. Induction of nuclear factor after low dose Ionizing radiation involves a reactive oxygen intermediate signaling pathway. **Radiat. Res**. v. 140 (1), p. 97-104, 1994.

MORAES, P. S. P. et al. Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa da *Tabebuia impetiginosa* (Ipê-roxo). **EVS - PUC GO**. v. 43, n. 1, p. 47-53. 2016.

MORAGAS, K. J. Estudo do gênero *Himatanthus* anatomia vegetal, fitoquímica, farmacologia e biotransformação. **Tese (doutorado) – UFRJ/NPPN - Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais**, 2006.

MOURA, M. D. B.; AGRA M. F. Apocynaceae tóxicas e medicinais ocorrentes nos estados de Pernambuco e Paraíba, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**. v. 3 (2), p. 273-279, 1989.

NIEMISTÖ, A. et al. Robust Quantification of In Vitro Angiogenesis Through Image Analysis. **Ieee Transactions On Medical Imaging**. v. 24, N. 4, 2005.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. **Immunity**. v. 41, n. 1, p. 49-61, 2014.

OLIVEIRA, A. A. Análise fitoquímica dos extratos e frações obtidos de *Himatanthus Sucuuba*. **Dissertação de Mestrado em Química - UFA**, 2013.

PARENTE, A. M. L. P. Contributo para o estudo da angiogênese em tumores mamários caninos: influência do fator de crescimento vascular do endotélio e da Ciclooxygenase 2. **Dissertação (Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial) –UTAD**, Portugal, 2012.

PAZ, M. F. C. J. et al. Avaliação tóxica, citotóxica, mutagênica e genotóxica do látex da *Himatanthus sucuuba*: uma questão de saúde pública. **Acta Biológica Paranaense**. v. 42, p. 7 - 27, 2013.

PEREIRA, M. et al. Caracterização por análise termo gravimétrica e análise elementar de CHN matriz de sílica gel organofuncionalizada com n-[3-(trimetoxisilil) propil] etilenotriamina e tetraetilortosilicato, em meio ácido. **IV Congresso Norte-Nordeste de Química**. Departamento de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.

PERON A. P. et al. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 6, n. 2, p. 127-130, 2008.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. Amsterdam, v. 39, p. 603-613, 2001.

REBOUÇAS, S. O. et al. The antigenotoxic activity of latex from *Himatanthus articulatus* **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 22 (2), p. 389-396, 2013.

REMA, R. B. et al. Angiogenic efficacy of Heparin on chick chorioallantoic membrane. **Vascular Cell**. v. 4:8, 2012.

RIBATTI, R. et al. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* Research on angiogenesis. **Int. J. Dev. Biol.** v. 40, p. 1189-1197, 1996.

RIBATTI, D. et al. The gelatin sponge–chorioallantoic membrane assay. **Nature Protocols-Electronic Edition**. v. 1, p. 85-91, 2006.

SAFATLE, A. M. V. et al. Implante de duas membranas biológicas em microbolsa corneana como modelo experimental de angiogênese. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 39, n.4 , p. 189-195, 2002.

SALEEM, M. L. A Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpene. **Cancer Letters**. v. 285 (2), p. 109–115, 2009.

SANTOS, M. G. O papel dos fatores abióticos e bióticos e dos atributos morfofuncionais na fenodinâmica do *Himatanthus bracteatus* (A. DC.) Woodson e *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae) na floresta ciliar do Rio dos Lençóis, Chapada Diamantina, Bahia. **Dissertação (mestrado) – UEFS**, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2016.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. 3. da UFRGS/UFSC, cap. 15. 2000.

SILVA, J. A. et al. Farmacognosia da planta ao medicamento, p.528-530. Ed. Da UFSC, 2ª edição, Florianópolis-Santa Catarina, 2000.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research**. v. 531, n. 1-2, p. 231-251, 2003.

SOUZA, L. E. Plantas medicinais referenciadas por raizeiros no município de Jataí, estado de Goiás. **Rev. Bras. Pl. Med.** Campinas, v. 18 n. 2, p. 451-461, 2016.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 42(2), p. 289-306, 2006.

VALE V. V. A natureza dessa interconexão envolve o aumento da migração e da proliferação de células inflamatórias bem como a ação regulatória de citocinas e de fatores de crescimento. **Dissertação de mestrado - UFP**, 2014.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** v. 27, n.1, p.1-7, 2006.

VEIGA-JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 18(2), p. 308-313, 2008.

ZIMMERMANN, M. et al. Teste de biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães. **Cienc. Rural, Santa Maria.** v. 37, n. 6, p. 1719-1723, 2007.

WILTING, J.; CHRIST, B.; WEICH, H. A. The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF165 and PDGF-BB. **Ana Embryol.** v. 186, p. 251-257, 1992.

WOOD, L. K. et al. A bioactive spirolactoneiridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuba*. **Chem Pharm Bull.** v. 49, n. 11, p. 1477-1478, 2001.

ANEXOS

Anexo 1 – A excicata do material depositado e registrado na Unidade de Conservação/PRPPG, no Herbário da Universidade Federal de Goiás – UFG, com o número de registro 49580.




**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNIDADE DE CONSERVAÇÃO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO**

Ofício Nº. 08, em 10/02/2017

Atesto que o espécime *Himantus obovatus* (M. Arg.) R.E. Woodson, cujo coletora Maria Alice Montes de Sousa nº 01, coleta de 28/06/2015, município de Marzagão/GO, recebeu número de Tombo UFG 49580.

Solicitamos o obséquio de devolver uma das guias datada e assinada.

Atenciosamente,



Curadoria do Herbário/UFG

Daniella de O. D. Neres
PRPI / Herbário / UFG
Mat. SIAPE: 1917517

Campus Samambaia – Cidade II – Avenida Esperança, Qd.07 – Caixa Postal 131 – CEP: 74001-910 – Goiânia-GO – Brasil
 Fone: (61) 321-1171-1185 – E-mail: herbario.prip@ufg.br; angelorico@ufg.br; daniadiniz26@gmail.com – Home
 Page: www.ufg.br