



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

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
ANGIOGÊNICA/ANTIANGIOGÊNICA,  
GENOTÓXICA/ANTIGENOTÓXICA DO ÓLEO DE  
CÁRTAMO (*Carthamus tinctorius*)**

**Goiânia**

**2017**

**LUCAS RODRIGUES SAMPAIO**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES  
ANGIOGÊNICA/ANTIANGIOGÊNICA,  
GENOTÓXICA/ANTIGENOTÓXICA DO ÓLEO DE CÁRTAMO  
(*Carthamus tinctorius*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Mestrado em Genética – MGene da Pontifícia Universidade Católica, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre(a) em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis

**Goiânia**

**2017**

S192a Sampaio, Lucas Rodrigues

Avaliação das atividades angiogênica/antiangiogênica,  
genotóxica/antigenotóxica do óleo de cártamo(*Carthamus  
tinctorius*) [manuscrito]/ Lucas Rodrigues Sampaio.--  
2017.

48 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 Genética, Goiânia, 2017

Inclui referências f.38-48

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

CDU:615.322(043)

ATA COMPLEMENTAR Nº 129/2017

MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: LUCAS RODRIGUES SAMPAIO

DEFENDIDA EM 09 DE MARÇO DE 2017 E APROVADO COM CONCEITO 4

O título foi alterado  não  sim \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura  
PUC Goiás



Prof. Dr. Alberto Magno Gonçalves  
Membro externo (UFG)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela força e coragem durante esta caminhada.

Aos meus pais, irmãos, e toda minha família que com muito carinho e apoio não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis, pela excelente orientação e por todo o tempo que dedicou a me ajudar durante o processo de realização deste trabalho.

À PUC Goiás e todo o corpo docente do Mestrado em Genética, por proporcionarem um ensino de extrema qualidade.

À banca de defesa, por aceitarem compartilhar seus conhecimentos e enriquecer este estudo com suas considerações.

À FAPEG, pelo incentivo à pesquisa e auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa etapa em minha vida.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT .....	X
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Plantas Medicinais.....	13
2.2 Óleos vegetais .....	14
2.3 <i>Carthamus tinctorius</i> .....	15
2.4 Angiogênese .....	18
2.5 Mutagênese e Antimutagênese.....	20
3 OBJETIVO.....	22
3.1 Objetivos específicos.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Materiais.....	23
4.1.1 Óleo extraído do <i>Carthamus tinctorius</i> (Óleo de cártamo) .....	23
4.1.2 Ovos embrionados da galinha.....	23
4.1.3 Substâncias utilizadas .....	23
4.2 Camundongos .....	23
4.2.1 Testes e controles .....	24
4.2.2 Padronização do ambiente .....	24
4.2.3 Condições de alojamento e higienização .....	24
4.2.4 Condições de alimentação dos animais.....	24
4.2.5 Aprovação em comitê de ética .....	25
4.3 Metodologia.....	25
4.3.1 Procedimento experimental para avaliação “in vivo” da atividade angiogênica/antiangiogênica na membrana corioalantoide do ovo embrionado de galinha.....	25
4.3.2 Procedimento experimental para avaliação “in vivo” da atividade mutagênica/antimutagênica através do teste do micronúcleo em medula óssea	

de camundongos.....	26
4.4 Análise Citogenética.....	27
4.4.1 Análise Estatística.....	27
5 RESULTADOS .....	28
5.1 Avaliação da atividade angiogênica/antiangiogênica do óleo de cártamo na membrana corioalantoide do ovo embrionado de galinha.....	28
5.2 Avaliação da atividade genotóxica/antigenotóxica, citotóxica/anticitotóxica do óleo de cártamo pelo teste de micronúcleo na medula óssea de camundongos.....	31
6 DISCUSSÃO .....	35
6.1 Avaliação da atividade angiogênica/antiangiogênica. ....	35
6.2 Avaliação das atividades genotóxica/antigenotóxica, citotóxica/anticitotóxica.....	36
7 CONCLUSÃO.....	38
8 REFERÊNCIAS .....	39

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sementes, folhas e flor do <i>Carthamus tinctorius</i> .....	17
Figura 2 – Cápsulas com óleo de cártamo.....	18
Figura 3 – Análise das mensurações do calibre da rede vascular na MCA do ovo embrionado de galinha.....	29
Figura 4 – Análise das mensurações do comprimento da rede vascular na MCA do ovo embrionado de galinha.....	30
Figura 5 – Análise das mensurações do número de junções da rede vascular na MCA do ovo embrionado de galinha.....	30
Figura 6 – Formação da rede vascular nos diferentes controles e no tratamento com o óleo de cártamo.....	31
Figura 7 – Frequência de micronúcleos para a atividade genotóxica.....	33
Figura 8 – Frequência de micronúcleos para a atividade antígenotóxica.....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Percentual de vascularização obtido no tratamento com óleo de cártamo e controles.....	28
Tabela 2 - Frequência de EPCMN e relação EPC/ENC na medula óssea de camundongos tratados em 24 horas com três doses do óleo de cártamo e controles.....	32
Tabela 3 - Frequência de EPCMN e relação EPC/ENC após tratamento simultâneo com doxorubicina em três doses do óleo de cártamo.....	33

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

aFGB	Fator cido de crescimento de fibroblastos
AL	cido linoleico
bFGB	Fator básico de crescimento de fibroblastos
CLA	cido linoleico conjugado
CT	<i>Carthamus tinctorius</i>
CTE	Extrato do <i>Carthamus tinctorius</i>
DXR	Doxorrubicina
ENM	Eritrócito Normocromático
EPC	Eritrócito Policromático
EPCMN	Eritrócito Policromático Micronucleado
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MCA	Membrana Corioalantoide
Mg	Miligrama
MN	Micronúcleos
MNEPC	Micronúcleo em Eritrócito Policromático
NaCl	Cloreto de Sódio
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PUFAs	cidos graxos poli-insaturados
RD	Retinopata Diabética
RPM	Rotações por minuto
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular
VEGFR	Receptor do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

## RESUMO

O estudo dos usos tradicionais de plantas e seus produtos têm aumentado gradualmente durante os últimos anos, o que resultou em um conjunto significativo de publicações nesta área. Os fitoterápicos correspondem a um princípio significativo de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituíram modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Portanto, inclui-se o *Carthamus tinctorius*, planta que faz parte da família Asteraceae, apresentando-se como uma cultura adaptada a condições adversas, sendo cultivada em todo o mundo devido às suas propriedades medicinais. O *Carthamus tinctorius*, contém um óleo de alta qualidade rico em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs). A cultura da erva tem um potencial de melhoria através de programas de melhoramento molecular devido à disponibilidade da diversidade genética e fenotípica significativa. Com o intuito de avaliar as atividades angiogênica e genotóxica do óleo de cártamo, foram realizados os testes de angiogênese na membrana corioalantoide (MCA) do ovo embrionado de galinha e o teste de micronúcleo em medula óssea hematopoiética de camundongos, onde os resultados do ensaio na MCA indicaram que o óleo provocou aumento significativo da rede vascular ( $p < 0,05$ ) em relação aos controles neutro e inibidor. No teste do micronúcleo, foram utilizadas doses de, 500, 1.000 e 1.500 mg.kg<sup>-1</sup>. Não foi observada atividade genotóxica nas doses de 500 e 1.000, uma vez que o número de micronúcleos foi menor ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle positivo doxorrubicina (DXR). Entretanto, na dose de 1.500 foi observado o efeito genotóxico, pois os valores de micronúcleos detectados foram semelhantes aos do controle positivo. Diante das técnicas e condições empregadas, as conclusões deste estudo reforçam que o óleo de cártamo apresenta potencial terapêutico, com atividade angiogênica e ausência de genotoxicidade nas doses de 500 e 1.000 mg.kg<sup>-1</sup>. No entanto, deve ser consumido moderadamente por conta da atividade genotóxica encontrada em doses elevadas.

**Palavras-chave:** *Carthamus tinctorius*, Óleo de cártamo, Angiogênese, Genotoxicidade, Mutagênese, Teste de micronúcleo.

## ABSTRACT

The study of traditional uses of plants and their products has gradually increased during the last years, which has resulted in a significant number of publications in this area. Phytotherapies correspond to a significant principle of biologically active natural products, many of which constituted models for the synthesis of a large number of drugs. Therefore, inserts it the *Carthamus tinctorius*, a plant that is part of the family Asteraceae, presenting themselves as a crop adapted to adverse conditions, being cultivated worldwide due to its medicinal properties. The *Carthamus tinctorius* contains a high quality oil rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs). The herb has potential for improvement through molecular breeding programs due to the availability of significant genetic and phenotypic diversity. In order to evaluate the angiogenic and genotoxic activities of safflower oil, angiogenesis tests were carried out on the chorioallantoic membrane (MCA) of embryonated chicken egg and micronucleus test on hematopoietic bone marrow of mice, where the results of the test in MCA Indicated that the oil caused a significant increase of the vascular network ( $p < 0.05$ ) in relation to the neutral and inhibitory controls. In the micronucleus test, the doses of 500, 1,000 and 1,500 mg.kg<sup>-1</sup> were used. No genotoxic activity was observed at doses of 500 and 1,000, since the number of micronuclei in relation positive control doxorubicin (DXR) was lower ( $p < 0.05$ ). However at the dose of 1,500, the genotoxic effect was observed, since the micronucleus values detected were similar to those of the positive control. In view of the techniques and conditions employed, the conclusions of this study reinforce that safflower oil presents therapeutic potential, with angiogenic activity and absence of genotoxicity in doses of 500 and 1,000 mg.kg<sup>-1</sup>. However, it should be consumed moderately because of the mutagenic activity found in high doses.

**Keywords:** *Carthamus tinctorius*, Safflower oil, Angiogenesis, Genotoxicity, Mutagenesis, Micronucleus test.

## 1 INTRODUÇÃO

Considerado um membro da família Asteraceae, o *Carthamus tinctorius* (CT) é uma planta empregada para diversos usos, tais como a produção de tintura, extração de óleo comestível e aplicações medicinais. A planta é cultivada em todo o mundo, sendo que o Cazaquistão e a Índia atualmente dominam a produção. O CT também tem sido explorado para a produção de biocombustível e óleo industrial, além de ter sido empregado recentemente na produção de produtos farmacêuticos importantes de interesse humano tais como a insulina e apolipoproteína (AMBREEN et al. 2015).

O CT é utilizado como medicamento tradicional chinês para melhorar a circulação sanguínea, aliviar a estagnação do sangue, doenças cerebrovasculares e cardiovasculares. Há cada vez mais estudos que demonstram a atividade biológica do CT e seus constituintes químicos. Tem sido relatado que a planta contém muitos compostos ativos incluindo quinochalones, flavonóides, alcalóides, poliacetileno, glucósidos aromáticos, e ácidos orgânicos. Além disso, a planta contém propriedades anti-oxidativas, anti-inflamatórias, efeitos neuroprotetores e anti-cancerígenos (MANEESAI et al. 2016).

Com cerca de 1.535 gêneros e aproximadamente 23.000 espécies, a família Asteraceae corresponde a mais ou menos 10% da flora mundial, e vem sendo fortemente estudada nos últimos 25 anos, não apenas quanto à sua estrutura, anatomia, ontogenia e ecologia, mas também quanto a sua fitoquímica, citogenética e estrutura macromolecular (BREMER 1996; HIND; BEENTJE, 1996; SEMIR 2001).

Devido ao seu excepcional poder de adaptação ambiental, as plantas da família Asteraceae podem ser encontradas nos mais diversos habitats, preferencialmente em ambientes campestres, condições climáticas variadas, regiões tropicais, subtropicais, até temperadas. A família está bem representada na América do Sul, onde contempla cerca de 20% da flora de algumas regiões andinas e da Patagônia. Na região Amazônica contém baixa diversidade desta família. (BARROSO et al. 1984; CANCELLI 2010).

Cada vez que as plantas medicinais são classificadas como produtos naturais, a maioria da população supõe que isso implica em “ausência de produtos tóxicos”. Como todo ser vivo, as plantas produzem compostos químicos a partir de metabolismo natural. Durante o processo evolutivo, elas desenvolveram mecanismos naturais de defesa e passaram a sintetizar substâncias químicas tóxicas e genotóxicas contra ataques de bactérias, fungos, insetos e animais predadores (TEIXEIRA et al. 2003). Entre essas substâncias, também conhecidas como metabólitos secundários, algumas já foram descritas como tóxicas, mutagênicas e

carcinogênicas, como é o caso de alguns flavanóides, taninos e alcalóides (DI CARLO et al. 1999; COLOMBO 2008).

As plantas também são capazes de sintetizar substâncias com elevado potencial nutricional, terapêutico e antimutagênico como os B-carotenos (vitamina A), o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E), os ácidos graxos, polifenóis, compostos sulfídricos, cálcio, fibras e os compostos antígeno-tóxicos, que em sua maioria são agentes antioxidantes capazes de sequestrar os radicais livres de oxigênio e proteger as células contra danos do DNA (AMES 1993; BOREK 1996; REN et al. 2001; KUMAR; VALLIKANNAN, 2010).

Os grandes avanços ocorridos na área da biologia molecular têm possibilitado uma melhor compreensão dos mecanismos de carcinogênese. Dentre estes, destaca-se a angiogênese como o processo através do qual as células tumorais estimulam a formação dos novos vasos sanguíneos necessários para o fornecimento dos nutrientes essenciais para seu crescimento acelerado (PINHO 2005).

A angiogênese tem seus mecanismos controlados por fatores ativadores (angiogênicos) e inibidores (antiangiogênicos), que se desenvolvem quando acontece algum estímulo que induz alguma mudança nas células endoteliais de um estado de quiescência para um estado de replicação e migração, formando capilares (SAFATLE et al. 2002, MARAGOUDAKIS 1998). Os fatores angiogênicos atuam seletivamente alterando as características das células estruturais do endotélio vascular, entretanto, não são afetadas as funções de outros tipos de células (MARAGOUDAKIS 1998; DEVITA 2002; DONATO 2003; MELO-REIS et al. 2010).

Já as avaliações da mutagenicidade são praticadas em bioindicadores de toxicidade, ou de efeitos adversos, que podem ser estabelecidos como: “qualquer resposta biológica, ao nível do indivíduo ou a um nível inferior, a um ambiente químico, que traduz a exposição a esse ambiente”; alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais incluem-se nesta. As substâncias antimutagênicas podem ser classificadas ou divididas em desmutagênicos, substâncias com papel de proteção ao inativar as substâncias mutagênicas antes de atuarem sobre o DNA e as substâncias bioantimutagênicas com capacidade de inibir a mutação por interferirem sobre os processos metabólicos de reparação inerentes a célula (KADA et al. 1978; W.H.O 1993; CAPELA 2001; BÜCKER et al. 2006).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Plantas Medicinais

A partir da década de 1960 a produção sintética de fármacos foi impulsionada dentro das indústrias farmacêuticas, por não haver comprovação científica da eficácia das substâncias de origem vegetal, havendo então desinteresse da indústria farmacêutica e de Instituições de Pesquisa. Entretanto, nos meados dos anos de 1980, o interesse pelos vegetais 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 (RATES 2001).

Um marco histórico mundial ocorreu em 1.803, à morfina (*Papaver somniferum*) foi o primeiro fármaco sintetizado a partir dos vegetais. 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 (CALIXTO; SIQUEIRA-JUNIOR, 2008).

No decorrer do século XX, as análises químicas e farmacológicas ocasionaram um alívio para danos que devastaram a raça humana durante séculos, como o câncer, a sífilis, a tuberculose e a hanseníase, da mesma forma para as endemias do mundo moderno como as cardiopatias a depressão e a AIDS. As altas ofertas de fármacos alopáticos, não foram suficientes para solucionar as complicações de saúde de grande parte da população. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% da humanidade não têm acesso à assistência primária de saúde, por encontrarem-se afastados dos centros ou por não terem condições financeiras para obter os medicamentos. Com isso, as plantas medicinais e outros tratamentos convencionais, são as terapias alternativas dessa população (VEIGA-JUNIOR 2008).

Ultimamente tem-se notado um enorme progresso científico que envolve as análises químicas e farmacológicas de plantas medicinais, com intenção de conseguir novos compostos com propriedades terapêuticas. Os químicos orgânicos tem conseguido esclarecer as estruturas moleculares complexas de elementos naturais de forma frenética, através do acréscimo de novas práticas espectroscópicas que até há pouco tempo eram difíceis de serem descobertas (FILHO; YUNES, 1998).

Os fitoterápicos são uma forma alternativa para o tratamento de doenças em várias partes do mundo por representarem uma fonte inesgotável de recursos naturais para obtenção de novos fármacos (SCHENCKEL et al. 2000). No Brasil a situação não tem sido diferente,

pois a imensa biodiversidade da nossa flora tem propiciado uma procura cada vez maior dos recursos advindos da natureza. Entretanto, as plantas medicinais não são tão “inócuas” quanto parecem. 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. Muitos desses compostos já foram identificados como mutagênicos e carcinogênicos, entre esses, podem ser citados flavonóides, hidrazinas, furocumarinas, quinonas, alcalóides de pirrolozidina e teobrominas. Além disso, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas e inclusive, empregadas diferentemente da forma utilizada na medicina tradicional. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública, os efeitos adversos dos fitomedicamentos e a ação sinérgica ocorrem comumente (PEREIRA 1992; CASTRO et al. 2004; KHAN et al. 2005; VEIGA-JUNIOR et al. 2005).

Os metabólitos secundários simbolizam um campo de interação química entre as plantas e o ambiente, sua biossíntese é constantemente atingida por condições ambientais. Os estudos sobre a atuação desses elementos devem ser destacados na produção de metabólitos secundários que em geral têm se estabelecido a um grupo exclusivo de espécies, influentemente ocorrentes em regiões temperadas, muitas das quais são comercialmente valiosas e podem ter suportado intensas pressões seletivas antrópicas, tendo em vista certas qualidades desejadas. Sua conduta, portanto, nem sempre é significativa de plantas selvagens ou de outras classes de ambientes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A exploração adequada dos princípios ativos de uma planta requer uma preparação correta, ou seja, para cada conjunto de princípio ativo a ser extraído, cada parte a ser consumida, ou doença a ser tratada, há maneiras de preparo e consumo mais adequados. As pesquisas biotecnológicas e o melhoramento genético de plantas medicinais podem apresentar benefícios, uma vez que torna possível alcançar regularidade e matéria de qualidade que são essenciais para a eficácia e segurança (ARNOUS et al. 2005).

## **2.2 Óleos vegetais**

Os óleos vegetais geralmente são encontrados nas sementes de plantas e ocasionalmente na polpa de frutos. São compostos principalmente de glicerídeos, contendo outros lipídeos em pequenas quantidades. Os ácidos graxos que esterificam o glicerol exibem, muitas vezes, cadeias alifáticas saturadas, mas, constantemente cadeias insaturadas estão presentes. As desigualdades funcionais entre os ácidos graxos que fazem parte dos óleos

vegetais definem as diferenças entre certas propriedades destes óleos tais como: calor e peso específicos, ponto de fusão, solubilidade, viscosidade, reatividade química e estabilidade térmica. Devido a grande variedade de óleos vegetais e alta produtividade (soja, mamona, dendê, algodão, pupunha), o Brasil demonstra grande abertura para uma nova alternativa energética no que se refere à substituição do diesel a partir de biocombustível, ou seja, o diesel produzido de óleos vegetais (ARAUJO et al. 2002).

A ampla eminência de matéria-prima vegetal no Brasil é bem conhecida, o país apresenta a área verde cultivável mais extensa do mundo e tem mão-de-obra acessível em grande abundância. O biodiesel é o biocombustível que se apresenta como alternativa potencial para o mundo agrícola e industrial. A variabilidade de plantas com potencial energético no Brasil para a produção de biodiesel em larga escala, vem crescendo a cada dia. No entanto, a comercialização ainda apresenta alguns obstáculos, devido ao preço da matéria-prima e os custos operacionais (ROSSETO et al. 2012)

Os óleos vegetais polinsaturados de sementes como milho, soja e canola simbolizam uma parcela significativa da dieta humana e, atualmente, o uso desses óleos tem crescido enquanto que o das gorduras de origem animal diminuiu. Ácidos graxos trans (AGT) também se compõem, em concentrações diminutas, nos óleos vegetais poli-insaturados submetidos à fritura e na etapa industrial de refino destes óleos. Sua formação está relacionada com o tipo de óleo, temperatura e tempo dos processos. Tem sido demonstrado que os AGT começam a se formar, por exemplo, em frituras com óleos vegetais poli-insaturados, em temperaturas a partir de 150 °C, sendo que os teores aumentam significativamente acima de 250 °C (AUED-PIMENTEL et al. 2009).

Os óleos vegetais comestíveis contém altas concentrações de tocoferóis e alguns tocotrienóis, além de apresentarem grande consumo em nível mundial, constituindo-se, portanto, nos alimentos de maior contribuição para a ingestão de vitamina E para a população. O óleo de girassol parece ser o mais rico em  $\alpha$ -tocoferol, seguido pelo de algodão, palma, canola, amendoim, oliva, milho, soja e coco. O  $\gamma$ -tocoferol é o composto predominante em óleos de soja e de milho, sendo que o óleo de palma é o que apresenta maior teor de tocotrienóis. O óleo de soja, devido ao grande consumo em nível mundial, é o principal contribuinte para a ingestão de vitamina E pela população (GUINAZI et al. 2009).

### **2.3 Carthamus tinctorius**

O *Carthamus tinctorius* (CT) pertencente à família Asteraceae, apresenta resistência a condições adversas, sendo cultivado em todo o mundo devido suas fontes medicamentosas (OBA et al. 2015). Na medicina tradicional chinesa, as pétalas da planta possuem propriedades medicinais que são utilizadas na terapêutica das enfermidades do homem. Acredita-se que para cada espécie exista um nível adequado de umidade disponível para que estas possam germinar de maneira mais rápida e uniforme, gerando metabólitos secundários importantes para o desenvolvimento das substâncias medicamentosas (EMONGOR 2010).

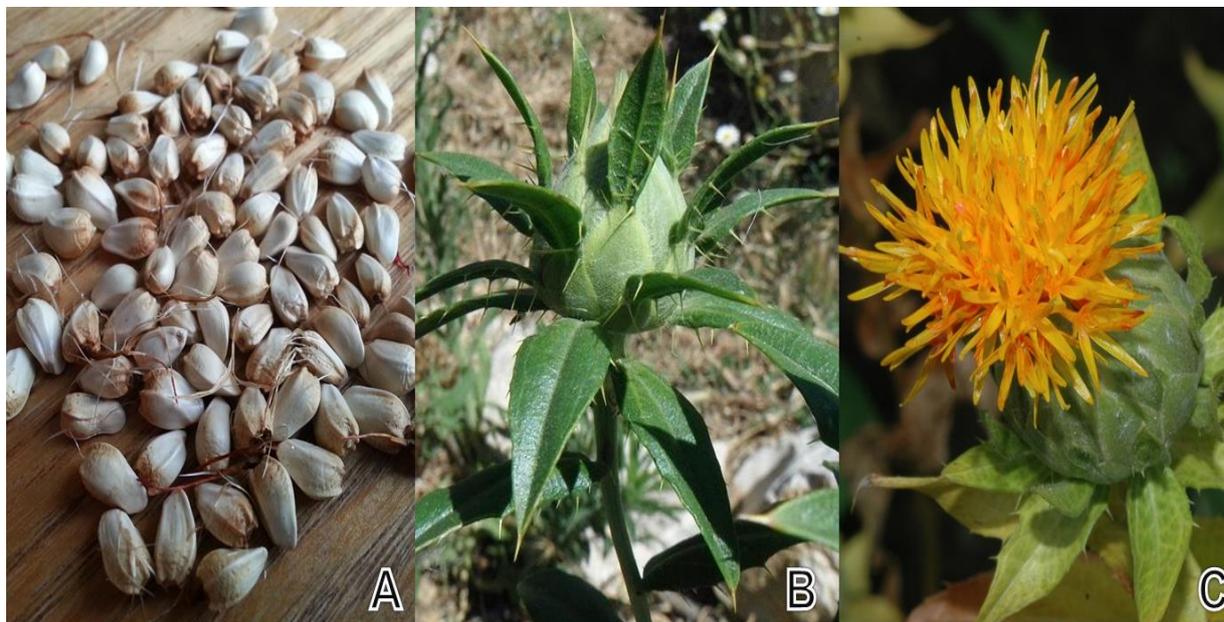
O CT é uma das plantas de sementes oleaginosas mais importantes que são utilizadas na produção de biodiesel, é também aceita como uma planta promissora para campos agrícolas secos. Com o cultivo generalizado desta planta, grandes contribuições serão feitas à economia nacional em termos de satisfazer a demanda e necessidade de produção de óleo vegetal e biodiesel (KULEKCI et al. 2009).

O CT tem sido cultivado para a produção de óleo e corantes. Atualmente, esta colheita fornece outras matérias primas (farelo, alpiste, e resíduos de processamento de óleo) para os mercados de alimentos e produtos industriais, embora esta cultura seja agora principalmente voltada para o óleo (BOZAN; TEMELLI, 2008).

O tamanho da planta pode variar de 0,3 a 2 metros de altura, com raiz altamente resistente. O caule produz ramificações em número variável e cada ramificação produz de 1 a 5 capítulos de coloração branca, amarela, laranja ou vermelha (BURKART 1974). Seu ciclo pode ser considerado curto, variando de 130 a 150 dias, podendo ser uma opção de cultivo na entre safra, ou no período de seca de algumas regiões agrícolas brasileiras. Nesse sentido pode não competir com as culturas tradicionais de maior importância econômica como a soja e o milho, na safra de verão (GALANT et al. 2015). A germinação ocorre entre 3 a 8 dias após a semeadura. O estágio de roseta é caracterizado pelo crescimento lento da planta e quando diversas folhas são produzidas próximas ao nível do solo. Esta fase pode durar de três a seis semanas dependendo do material genético e das condições ambientais, especialmente a temperatura. Esta é a etapa mais crítica do desenvolvimento da planta por apresentar um crescimento lento, que a torna bastante sensível à competição por água, luz e nutrientes com as plantas invasoras (OELKE et al. 1992).

Os principais componentes de produção do cártamo são os números de plantas por área, números de capítulos por planta, números de grãos por capítulo e massa de grãos (GILBERT; TUCKER, 1967). Esses componentes podem ser afetados por fatores, como por exemplo: genótipo, condições ambientais e práticas culturais (KOUTROUBAS et al. 2008).

Seu manejo não necessita de uso de tecnologias específicas para a cultura, pode-se fazer uso de maquinários já utilizados em outras culturas, necessitando apenas de pequenas adaptações, tornando seu custo de produção mais acessível (SILVA 2013).



**Figura 01** - Sementes, folhas e flor do *Carthamus Tinctorius*. A – Sementes. B - Folhas. C – Flor. **Fonte:** Thistle-Garden 2016.

Pesquisas realizadas com o consumo do óleo de cártamo têm sido exploradas e demonstraram que o mesmo é benéfico à saúde. Dentre os benefícios descritos na literatura sobre o consumo do óleo de cártamo destacam-se: a prevenção e o tratamento de hiperlipidemia com redução nas concentrações de triglicerídeos, colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL), redução das lesões ateroscleróticas, prevenindo doenças cardíacas e hipertensão, estimulação do sistema imunológico e redução da massa corporal (BERTIN 2014). O óleo apresenta característica insípida e incolor com composição semelhante ao óleo de girassol (KAFFKA; KEARNEY, 1998). Apresenta alto teor de ácido linoleico (70 a 87%) (HAN et al. 2009). É uma cultura com grande potencial devido à elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados associados aos elevados teores de tocoferol (VELASCO; FERNANDEZ-MARTINEZ, 2002).



**Figura 02** - Cápsulas com óleo de cártamo. **Fonte:** Paron 2013.

As sementes podem chegar a 50% de teor de óleo. O óleo tem qualidade aprovada tanto para consumo humano quanto para a indústria. A semente do CT é uma das fontes de azeites comestíveis mais apreciadas pelos consumidores ao redor do mundo, o qual, não se oxida facilmente e não causa aumento de colesterol no sangue (MÜNDEL et al. 2004; GALANT et al. 2015).

#### **2.4 Angiogênese**

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos capilares preexistentes. A angiogênese está presente em processos fisiológicos como a menstruação, ovulação, cicatrização de feridas e outros. A angiogênese está presente também nos processos patológicos como artropatias crônicas, psoríase, retinopatia diabética, degeneração macular, crescimento tumoral e disseminação metastática (FOLKMAM; INGBER, 1992; GONZALEZ et al. 2008). Como a angiogênese pode também levar ao crescimento e disseminação metastática do tumor maligno, o aumento da rede vascular aumenta a possibilidade de células tumorais entrarem na corrente sanguínea e muito provavelmente originar metástases (FOLKMAM 1972; SAFLATE et al. 2002; FOLKMAM 2004).

O processo de angiogênese envolve uma sequência complexa de eventos. Com a estimulação angiogênica, as células endoteliais vasculares aumentam sua expressão e a secreção de metaloproteinases para quebrar a matriz extracelular do tecido, aumentar a

motilidade das células endoteliais e sofrer proliferação celular para fornecer o número necessário de células para os vasos em crescimento (CAO et al. 2005).

A aplicação comum ou habitual, não é o bastante para regularizar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Assim, é necessária a elaboração de novas pesquisas farmacológicas e toxicológicas para constatarem ou não sua eficácia e avaliarem sua segurança. Várias espécies de plantas com atividade angiogênica já confirmaram sua eficácia em relação à cicatrização de feridas, que é um processo decorrente da formação de novos vasos sanguíneos. A cicatrização ocorre em três períodos sobrepostos: fase inicial, inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelação ou maturação. Cada uma dessas fases é definida pela presença de infiltrados de células em locais específicos, que ocorre de forma integrada e coordenada por mediadores químicos, no sentido de otimizar o reparo. Assim, de modo geral, o principal parâmetro avaliado na cicatrização de feridas em modelos animais é a redução do tamanho da ferida, normalmente expressa em termos de área (TRESVENZOL et al. 2013). As análises histológicas do tecido de granulação e epidérmicos complementam a avaliação (KRISHNAN 2006).

Em algumas situações, a angiogênese é regulada com períodos de ativação e inibição. Algumas doenças oculares como a RD (Retinopatia Diabética), o glaucoma neovascular, as oclusões vasculares, a retinopatia da prematuridade e a degeneração macular relacionada à idade também apresentam alteração da angiogênese (SENGER 1983; SHIMA 1995).

O modo como os agentes etiopatogênicos agredem o nosso organismo e os sistemas naturais de defesa, reagem de algumas doenças que são determinadas pela resposta angiogênica persistente. Isso ocorre devido a uma deficiência dos inibidores da angiogênese, ou um aumento significativo dos mediadores angiogênicos, como por exemplo: neoplasias, metástases, psoríase e artrite reumatoide, entre outras (VAN 1993; BLAAUWGEERS 1999; JOHNSON 2001). Folkman (1971) sugeriu que o controle da angiogênese poderia ser útil no controle do crescimento tumoral. Esse conceito de antiangiogênese foi aplicado a outras doenças e vem sendo estudado extensivamente nos últimos anos.

As células endoteliais apresentam rápida capacidade de divisão em resposta a estímulos fisiológicos, os quais podem resultar na ativação de angiogênese. Neste sentido, inúmeros peptídeos são conhecidos por apresentarem atividade reguladora de angiogênese, como o fator ácido de crescimento de fibroblastos (aFGF), fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), a angiogenina, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF),

fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), dentre outros (KARAMYSHEVA 2008; VALIATTI et al. 2011).

## 2.5 – Mutagênese e Antimutagênese

O surgimento de mutações acontece em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para o progresso e variedade das espécies. Algumas mutações passam despercebidas e não provocam modificações detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo. Com a ausência das mutações, os organismos não seriam capazes de evoluir e adaptar-se às mudanças ambientais (RIBEIRO; MARQUES, 2003). As pesquisas sobre mutagenicidade com o uso de fitoterápicos têm-se propagado com o crescimento do uso terapêutico e com a importância de constatar a eficácia dos mesmos nas múltiplas aplicações farmacológicas. Consequências disso são as várias plantas utilizadas por um grande número de pessoas, que possuem propriedades farmacológicas e também causam alterações no DNA. Os perigos são ainda mais graves quando a utilização de tratamentos clínicos alternativos apresentam-se de forma não controlada, sem o cuidado adequado quanto a identificação correta da planta, a parte do vegetal a ser utilizada e a forma de preparo e administração (VARANDA 2006).

Diversos estudos com mais de 150.000 espécies de plantas tem sido realizados e mostram que várias delas contêm elementos terapêuticos, que podem ser retirados e empregados no preparo de drogas ou utilizados diretamente como medicação, que é uma prática popular em algumas populações. Entretanto, os vegetais com efeitos terapêuticos em geral, também sintetizam substâncias tóxicas, que *in natura* agem como uma defesa contra infecções, insetos e herbívoros, podendo atingir o organismo que faz uso delas. Desse modo, as avaliações do potencial de citotoxicidade e mutagenicidade são necessárias. (TEIXEIRA et al. 2003; PINHO et al. 2010).

Várias das substâncias que existem nos vegetais podem ter efeitos mutagênicos, ao contrário de outras que podem atenuar ou anular estes efeitos (STURBELLE et al. 2010). O potencial antimutagênico de um elemento pode ser analisado em diversos sistemas biológicos, empregados no estudo e identificação dos agentes mutagênicos. Os sistemas celulares de mamíferos envolvem os testes *in vitro* e *in vivo*, além de serem utilizados para uma análise de mutagenicidade e/ou antimutagenicidade. Geralmente, ratos e camundongos são utilizados nos testes *in vivo*. Nos testes *in vitro*, diferentes linhagens celulares são utilizadas, inclusive células humanas. Os linfócitos humanos e as células do ovário de hamster chinês são as mais

utilizadas como mecanismo de avaliação da antimutagenicidade de inúmeros agentes químicos (ANDERSON et al. 1995; WATERS et al. 1996; ANTUNES; ARAUJO, 2000).

Como referência de ensaios *in vivo*, o teste de micronúcleo é um dos mais utilizados para análise do potencial mutagênico e antimutagênico. Os agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) também podem ser detectados através do teste que é internacionalmente aceito para a avaliação do potencial mutagênico. Inicialmente, este teste foi desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos (TAKAHASHI et al. 2004; XAVIER; NETO, 2005).

Os resultados da mutagênese podem ser verificados por meio do surgimento de micronúcleos, que são pequenos corpos possuindo ácidos desoxirribonucleicos (DNA), encontrados no citoplasma, resultantes de quebras cromossômicas, criando partículas acêntricas, ou com sequências de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma, não alcançam os polos das células durante a mitose ou a meiose. Um fragmento cromossômico acêntrico ou cromossomo inteiro não se agrega ao novo núcleo (por não estar unido), este também pode conter um pequeno núcleo individual, chamado de micronúcleo (FÃO et al. 2012).

Contudo, independentemente do grande número de elementos potencialmente mutagênicos, sabe-se muito pouco sobre o efeito deles no material genético. Cerca de 25.000 substâncias que o homem tem acesso com maior facilidade, como a espécie de algumas plantas e os aditivos alimentares, podem ser atestados ou estão sob suspeita quanto à expectativa de efetuarem um papel mutagênico sobre os animais submetidos à experimentação científica (LIMA 1996; DA; BAYNES, 2000; SHILS 2003; RODRIGUES 2004).

### **3 OBJETIVO**

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade angiogênica e/ou antiangiogênica, o potencial mutagênico e/ou antimutagênico do óleo extraído do *Carthamus tinctorius* (óleo de cártamo).

#### **3.1 - Objetivos específicos**

Avaliar a possível atividade angiogênica e/ou antiangiogênica do óleo extraído do *Carthamus tinctorius* mediante realização de testes laboratoriais “*in vivo*”, utilizando como modelo experimental a membrana corioalantoide do ovo embrionado de galinha.

Avaliar o potencial mutagênico do óleo extraído do *Carthamus tinctorius* mediante a realização de experimentos “*in vivo*”, utilizando como modelo experimental o teste de micronúcleo em medula óssea hematopoiética de camundongos.

Avaliar o potencial antimutagênico do óleo de cártamo mediante a realização de experimentos “*in vivo*”, pelo tratamento simultâneo do óleo e de um composto sabidamente mutagênico, doxorubicina, utilizando o teste de micronúcleo em medula óssea hematopoiética de camundongos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Materiais**

#### **4.1.1 – Óleo extraído do *Carthamus tinctorius* (Óleo de cártamo)**

Óleo extraído do *Carthamus tinctorius* (óleo de cártamo), lote nº: 1085747, validade setembro de 2018, fabricado por Colbras Indústria e Comércio Ltda, CNPJ N<sup>o</sup>: 00.413.925/0001-64, com sede em Cotia-SP, sob responsabilidade técnica de Dra. Fernanda Cerveira Ernica, inscrito no Conselho de CRF – SP 37.702.

#### **4.1.2 – Ovos embrionados da galinha**

Foram adquiridos 60 ovos férteis de galinha (*Gallus domesticus*) junto à granja da Chácara São Domingos, a qual se localiza no km 09 da estrada velha para Bela Vista, Vale dos Pampas, Aparecida de Goiânia – Goiás.

#### **4.1.3 - Substâncias utilizadas**

- a) Controle inibidor. Solução de dexametasona injetável, na concentração de 4mg/mL - Aché Laboratórios Farmacêuticos, Lote nº: 1513259, validade em dezembro de 2017.
- b) Controle negativo: Água para Injeção, Samtec Biotecnologia Ltda, Lote: CIA, validade em junho de 2018.
- 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: CCK, validade em dezembro de 2017.
- e) Solução teste. Óleo de cártamo, na com concentração de 1.000 mg/ml.

### **4.2 – Camundongos**

Para realizar os testes de mutagenicidade e antimutagenicidade, foram utilizados 48 camundongos machos heterogênicos saudáveis, da espécie *Mus musculus* “outbred” linhagem *Swiss Webster*, oriundos 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.

#### **4.2.1 Testes e controles**

Foram preparadas diluições a partir do óleo de cártamo nas doses de 500, 1.000 e 1.500 mg.kg<sup>-1</sup>. Utilizou-se como veículo diluidor e controle negativo o óleo soja, e como controle positivo, solução aquosa de Doxorubicina na dose de 2,0 mg.kg<sup>-1</sup>.

Cada grupo foi constituído por 06 camundongos *Mus musculus* para os ensaios pretendidos:

- 1 - Grupo Teste da mutagenicidade – 18 camundongos.
  - 2 - Grupo Teste da antimutagenicidade – 18 camundongos.
  - 3 – Grupo controle positivo - 6 camundongos.
  - 4 – Grupo controle negativo - 6 camundongos.
- Totalizando 48 animais.

#### **4.2.2 Padronização do ambiente**

Os animais foram adaptados ao espaço físico do Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos (LEB) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, situado na Rua 232, Nº 128, Setor Universitário, Área V, 3º andar, Sala 05 (Próximo a Praça Botafogo), CEP 74605-140, Goiânia – GO. A adaptação dos animais ao ambiente proposto priorizou o bem-estar de forma que as gaiolas ficassem próximas umas das outras para diminuir o estresse entre os animais.

A luminosidade, a temperatura, a intensidade de ruído e a umidade relativa do ar foram as do ambiente geral. O experimento teve início após o período de sete dias de ambientação, conforme preconizado pelos comitês de ética.

#### **4.2.3 Condições de alojamento e higienização**

Os animais foram alojados em gaiolas de prolipropileno de dimensões 30x20x13 cm. Cada gaiola abrigou no máximo 05 (cinco) animais.

As gaiolas foram forradas com maravalha e a higienização foi realizada de 02 em 02 dias, com troca da mesma.

#### **4.2.4 Condições de alimentação dos animais**

Os camundongos foram alimentados com ração comercial, Marca “Ração Presence para Ratos e Camundongos” indicada para animais de laboratório (ratos e camundongos).

O teste do micronúcleo não exige restrição alimentar. Portanto, foram fornecidos alimentos sólidos (ração Presence) e água filtrada à vontade (*ad libitum*). Consumo aproximado de 05 gramas/animal/dia.

#### **4.2.5 Aprovação em comitê de ética**

O presente trabalho teve a avaliação e a aprovação da CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, protocolo nº 1.237.230.316 em 11 de setembro de 2016.

### **4.3 Metodologia**

**4.3.1 Procedimento experimental para avaliação “*in vivo*” da atividade angiogênica/antiangiogênica na membrana corioalantoide do ovo embrionado de galinha**

Os ovos embrionados de galinha foram incubados em estufa automática na temperatura de 38°C em ambiente úmido (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. A realização do teste foi feita dentro de uma câmara de fluxo laminar, em ambiente previamente esterilizado com luz ultravioleta para não haver contaminações recíprocas.

Após a realização da abertura na casca do ovo (utilizando-se seringa e solução salina estéreis) foi depositada uma gota de cloreto de sódio (NaCl 0,9% p/v) para auxiliar na retirada da membrana da casca, expondo a MCA já vascularizada. A abertura, então, foi vedada com fita adesiva transparente e o ovo novamente incubado, porém, sem agitação periódica e com a base furada voltada para cima.

Ao final do 13° dia de incubação, discos de papel de filtro veiculando 3 µL do óleo a ser testado com os controles (negativo, indutor e inibidor), foram depositados diretamente sobre a membrana de forma cuidadosa. O ambiente foi totalmente estéril. Todos os ovos voltaram para a incubação até o 16° dia, quando foram retirados da incubadora para a adição da solução de formol (3,7% v/v) até a abertura da casca do ovo.

Todas as MCAs foram fixadas com solução de formol (3,7 % v/v) por 10 minutos, cortadas detalhadamente, retiradas e mantidas em placa de Petri com solução de formol. Posteriormente, foram obtidas por equipamento digital, as fotografias sobre um fundo branco

no tamanho de 640 x 480 pixels e formato de RGB 24 bites, padronizados com o objetivo de analisar e quantificar a rede vascular (WILTING et al. 1992).

As redes vasculares das membranas foram quantificadas utilizando o software AngioQuant versão 1.33. Os parâmetros analisados foram comprimento, calibre e número de junções dos vasos sanguíneos.

A análise estatística dos dados obtidos foi feita utilizando o software BioEstat versão 5.3. Os grupos amostrais foram analisados primeiramente pela análise de variância ANOVA – teste de Tukey. As diferenças entre os grupos (controles e teste) foram consideradas significativas quanto P apresentava valores menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

#### **4.3.2 Procedimento experimental para avaliação “*in vivo*” da atividade mutagênica/antimutagênica através do teste do micronúcleo em medula óssea de camundongos**

O experimento teve início após o período de sete dias de ambientação no Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde e Mestrado em Genética, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, conforme preconizado pelos comitês de ética

Cada grupo foi constituído por 6 camundongos albinos *Mus Musculus* que foram tratados, intraperitoneal, com as doses de 500, 1.000 e 1.500 mg.kg<sup>-1</sup> do óleo do *Carthamus tinctorius*. O grupo controle negativo foi tratado com óleo de soja puro, enquanto que o grupo controle positivo recebeu dose única intraperitoneal de 2 mg.kg<sup>-1</sup>, de doxorubicina. Para a avaliação da antimutagenicidade, foram administradas as doses de 500, 1.000 e 1.500 mg.kg<sup>-1</sup> do óleo do *Carthamus tinctorius*, concomitantemente com dose de 2 mg.kg<sup>-1</sup> de doxorubicina.

Após 24 horas, os camundongos foram submetidos à anestesia por Tiopental (30 mg.kg<sup>-1</sup>), em seguida, realizou-se a eutanásia por deslocamento cervical. Os fêmures foram retirados, as epífises do fêmur foram seccionadas e a medula óssea foi lavada com 01 ml de soro fetal bovino. Após homogeneização da medula no soro, a centrifugação foi feita à 1.000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante parcialmente descartado. O precipitado de células foi homogeneizado com pipeta de Pasteur. Uma gota de suspensão celular foi transferida para a lâmina de vidro onde foi confeccionado o esfregaço das células da medula óssea hematopoiética. Após a secagem das lâminas, foi feita a fixação das mesmas em metanol absoluto durante 05 minutos e a coloração em solução Corante de Giemsa tamponada, com

pH de 6,8 por um período de 15 minutos (HEDDLE 1973). As lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em temperatura ambiente.

A confecção dos esfregaços e análise das lâminas coradas e secas foi realizada pelo procedimento “duplo-cego”, avaliando-se a quantidade de eritrócitos policromáticos micronucleados em 2.000 eritrócitos.

#### **4.4 Análise Citogenética**

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum Nikon com a finalidade de se detectar possíveis alterações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) da medula óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. As células foram visualizadas em objetiva de imersão de 100x, usando duas lâminas para cada animal, avaliando-se 2.000 EPC por lâmina. Foi utilizada a média de duas lâminas como resultados. Para a avaliação da citotoxicidade, foram contados eritrócitos policromáticos (EPC) e eritrócitos normocromáticos (ENC). A razão EPC/ENC foi determinada conforme Schmid (1975).

##### **4.4.1 Análise Estatística**

As frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em 2.000 EPC de cada grupo foram comparadas em relação ao grupo controle negativo e positivo pelo teste de análise de variância (ANOVA) e todos os pares comparados pelo teste de Tukey. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

As frequências de EPC e ENC de cada grupo tratado com o óleo foram comparadas com o grupo controle negativo e positivo por teste de ANOVA, e todos os pares comparados pelo teste de Tukey. Também foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da atividade angiogênica/antiangiogênica do óleo de cártamo na membrana corioalantoide do ovo embrionado de galinha.

Foi analisada a atividade angiogênica do óleo de cártamo na concentração de 1.000mg/ml na membrana corioalantoide do ovo embrionado de galinha (MCA). A água destilada foi utilizada como controle negativo, a dexametasona como controle inibidor e o regederm (Pele Nova Biotecnologia) como controle positivo. 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).

Por intermédio do software AngioQuant, foi medido o comprimento, o calibre, e o número de junções dos vasos sanguíneos formados na membrana corioalantoide. As médias e os desvios padrões estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1.** Médias e desvios padrões obtidos na mensuração do comprimento, do calibre e do número de junções dos vasos sanguíneos nos controles e no teste (óleo de cártamo), utilizando o software AngioQuant.

Grupos	Comprimento	Calibre	Número de junções
Controle inibidor (Dexametasona)	456,2 ± 108,3 <sup>a</sup>	2656,6 ± 759,9 <sup>d</sup>	4,5 ± 2,0 <sup>g</sup>
Controle negativo (H <sub>2</sub> O)	1983,2 ± 286,3 <sup>b</sup>	6781,5 ± 865,8 <sup>e</sup>	23,7 ± 2,2 <sup>h</sup>
Controle positivo (Regederm)	2913,3 ± 332,2 <sup>c</sup>	9270,3 ± 1151,2 <sup>f</sup>	44,1 ± 3,4 <sup>i</sup>
Teste (Óleo de Cártamo)	2884,1 ± 274,5 <sup>c</sup>	9512,2 ± 1239,2 <sup>f</sup>	63,3 ± 3,9 <sup>j</sup>

ANOVA – Teste Tukey.

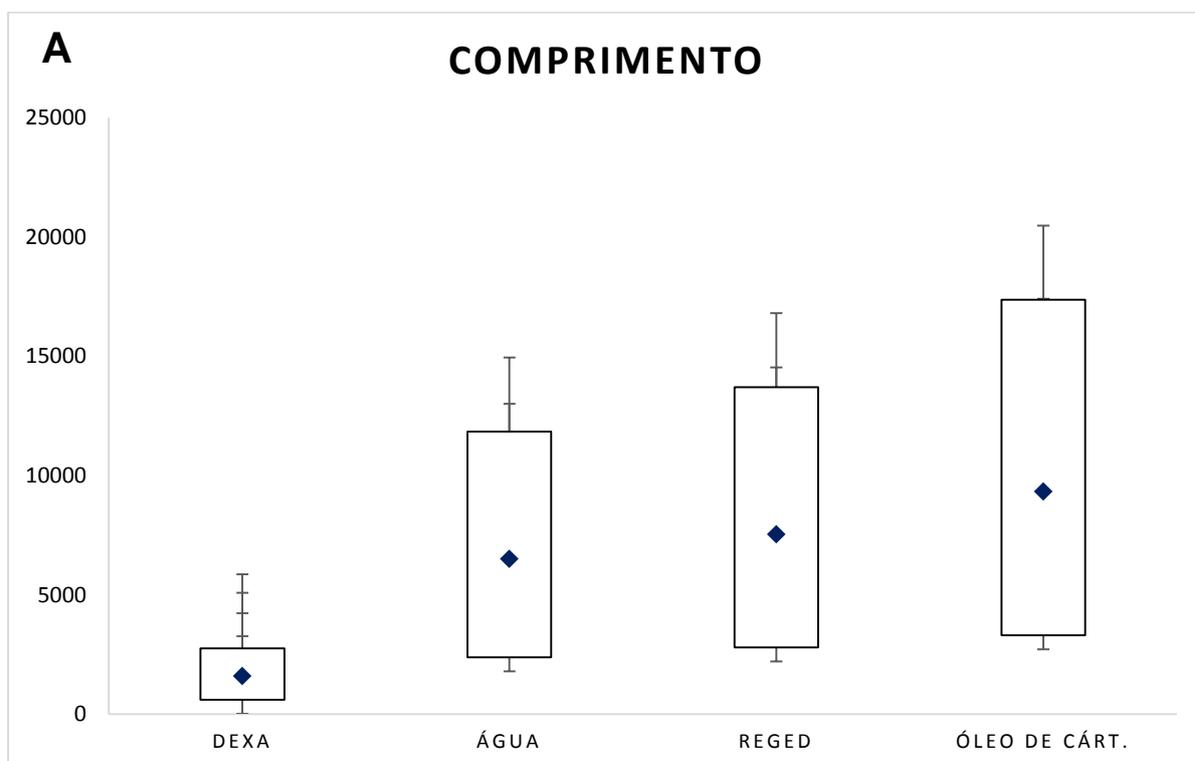
Letras iguais – não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Letras diferentes – houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Na tabela 1, foi observado que em relação ao comprimento dos vasos sanguíneos mensurados na MCA, o óleo de cártamo apresentou aumento da rede vascular quando comparado aos controles negativo ( $p < 0,05$ ) e inibidor ( $p < 0,05$ ). Entretanto, quando comparado ao controle positivo, não foi constatada diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Portanto, o óleo de cártamo e o controle positivo apresentaram aumento significativo na formação da rede vascular. Foi observado também, que o controle inibidor apresentou significativa redução da vascularização na MCA do ovo embrionado de galinha em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

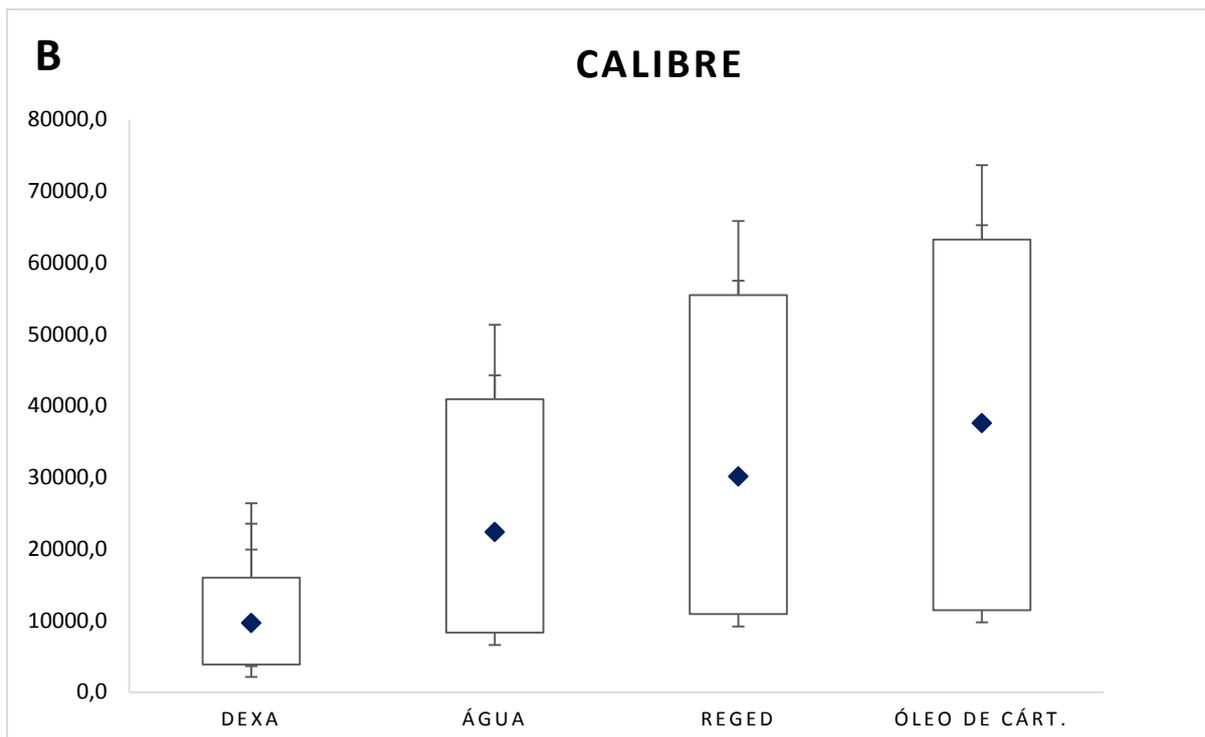
Em relação ao calibre dos vasos sanguíneos avaliados na MCA do ovo embrionado de galinha, o óleo de cártamo apresentou aumento quando comparado aos controles negativo ( $p < 0,05$ ) e inibidor ( $p < 0,05$ ). Entretanto, quando comparado ao controle positivo, não foi constatada diferença significativa ( $p > 0,05$ ). Portanto, o óleo de cártamo e o controle positivo apresentaram aumento significativo na formação da rede vascular. Observou-se também, que o controle inibidor apresentou significativa redução da vascularização na MCA em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

Em relação ao número de junções dos vasos sanguíneos que foram analisados na MCA do ovo embrionado de galinha, o óleo de cártamo apresentou aumento do número de junções quando comparado aos controles negativo ( $p < 0,05$ ) e inibidor ( $p < 0,05$ ) e ao controle positivo. Portanto, o óleo de cártamo e o controle positivo apresentaram aumento significativo na formação da rede vascular. Observou-se também, que o controle inibidor apresentou significativa redução da vascularização na MCA em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$ ).

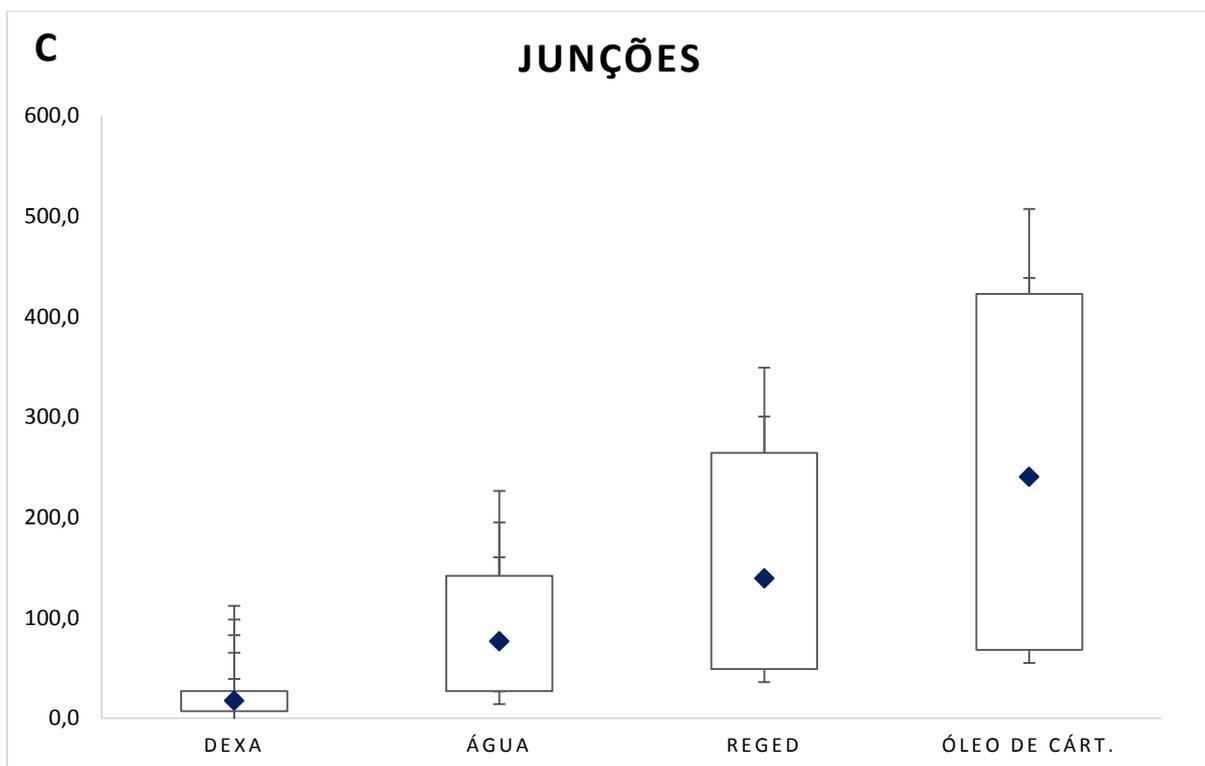
As figuras 3, 4 e 5 mostram os gráficos com as análises das mensurações do (A) comprimento, (B) calibre e (C) número de junções das redes vasculares nas MCAs tratadas com dexametasona (controle inibidor), água (controle negativo), regederm (controle positivo) e óleo de cártamo (teste). Parâmetros obtidos através da quantificação feita pelo software AngioQuant.



**Figura 03** – Gráfico Box plot das médias obtidas do comprimento das amostras das MCAs após o tratamento com o óleo de cártamo e controles.

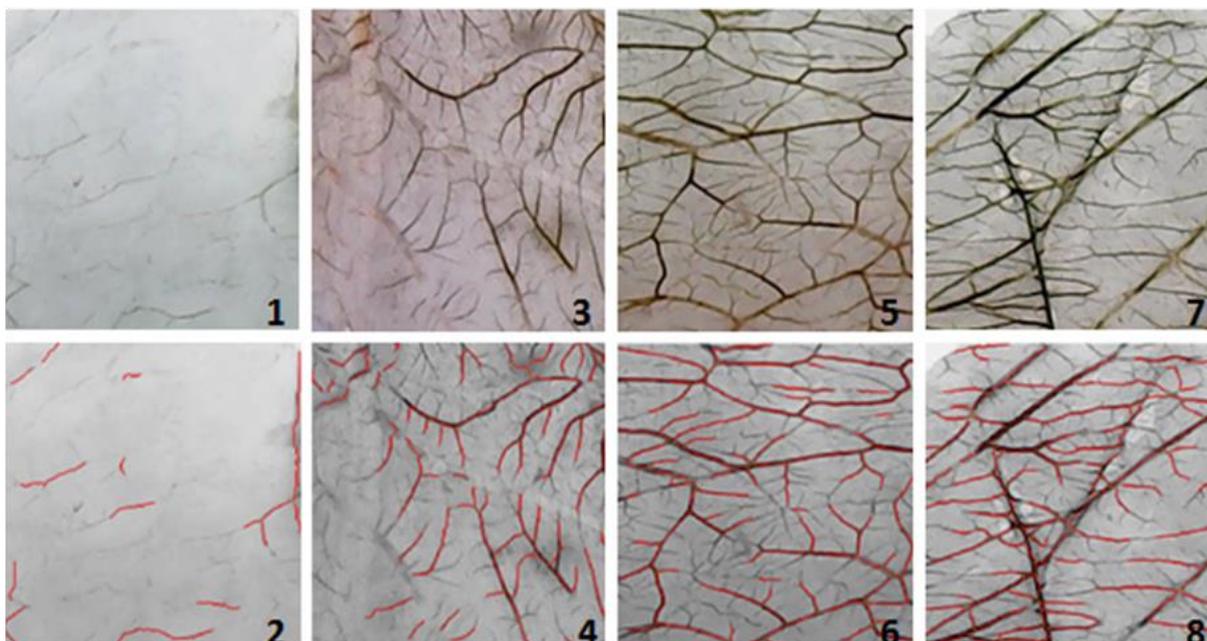


**Figura 04** – Gráfico Box plot das médias obtidas do calibre das amostras das MCAs após o tratamento com o óleo de cártamo e controles.



**Figura 05** – Gráfico Box plot das médias obtidas do número de junções das amostras das MCAs após o tratamento com o óleo de cártamo e controles.

As imagens apresentadas na figura 06 mostram a formação da rede vascular nos diferentes controles e no tratamento com o óleo de cártamo.



**Figura 06** - Imagens representativas da rede vascular formada nas membranas corioalantoides (MCAs) do ovo embrionado de galinha antes e após a quantificação com o AgioQuant. 1 e 2 MCA tratada com dexametasona (controle inibidor), 3 e 4 tratamento com água (controle neutro), 5 e 6 tratamento com regederm (controle positivo), 7 e 8 tratamento com óleo de cártamo (teste).

## **5.2 Avaliação das atividades genotóxica, antigenotóxica, citotóxica e anticitotóxica do óleo de cártamo pelo teste de micronúcleo na medula óssea hematopoiética de camundongos.**

Para a avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica do óleo de cártamo foi realizado o teste do micronúcleo na medula óssea hematopoiética de camundongos.

Os resultados da frequência de MNEPC, média, desvio padrão e relação EPC/ENC para as atividades genotóxica e antigenotóxica estão representados nas tabela 02 e figura 07, respectivamente.

**Tabela 2** - Frequência de MN/2000 EPC e relação entre EPC/ENC após 24 horas do tratamento com óleo de cártamo em 03 doses e controles.

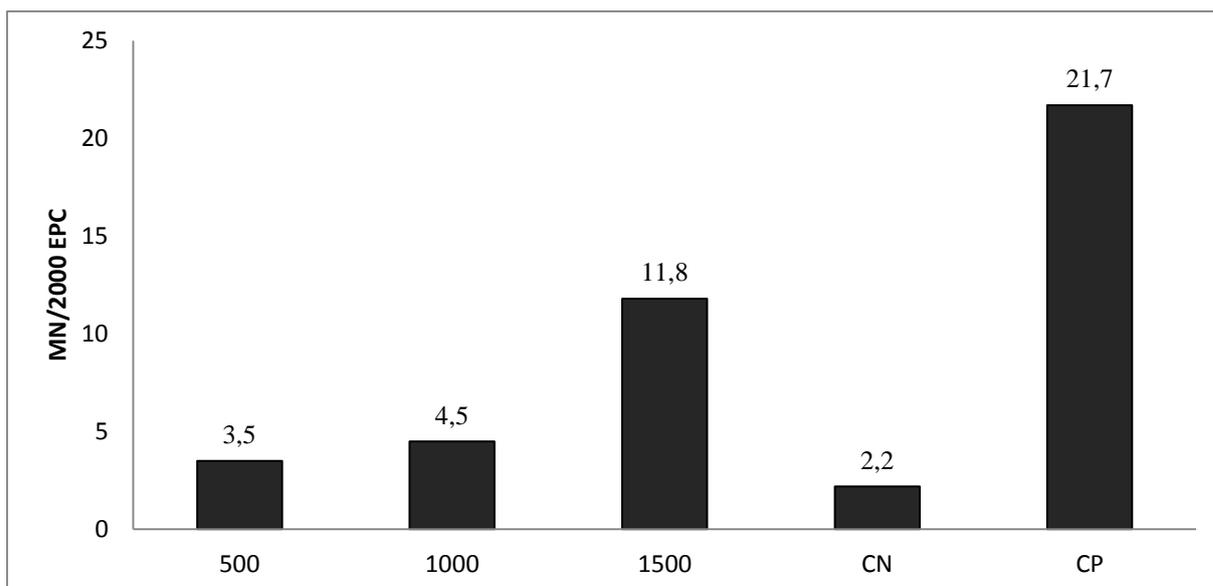
Doses do óleo de cártamo (mg.kg <sup>-1</sup> peso corporal)	Nº de animais	Eritrócitos policromáticos micronucleados (MNEPC)		RELAÇÃO EPC/ENC MÉDIA ± DP
		Dados Individuais MN /2000EPC	MN/2000 EPC Média ± DP	
500	6	5-3-3-4-3-3 <sup>a</sup>	3.5 ± 0,89 <sup>a</sup>	0.75 ± 0,14 <sup>c</sup>
1000	6	4-5-3-4-5-6 <sup>a</sup>	4.5 ± 0,84 <sup>a</sup>	0.72 ± 0,18 <sup>c</sup>
1500	6	13-14-11-12-10-11 <sup>b</sup>	11.8 ± 1,58 <sup>b</sup>	0.69 ± 0,05 <sup>d</sup>
Óleo de soja (controle negativo) *	6	2-3-2-2-3-1 <sup>a</sup>	2.2 ± 0,55 <sup>a</sup>	0.92 ± 0,08 <sup>c</sup>
Doxorrubicina (controle positivo) **	6	25-27-18-16-24-20	21.7 ± 4,74	0.48 ± 0,11

a P> 0,05 ; b P<0,05; c P>0,05; d P<0,05. Todos os resultados foram comparados com o grupo controle negativo. O valor de P menor que 0,05 (p<0,05) foram considerados indicativos de significância.

\*Controle negativo: óleo de soja; \*\* Controle Positivo: Doxorrubicina (2mg.kg<sup>-1</sup> peso corporal).

Na tabela 2 foi observado que as doses de 500 e 1.000 mg.kg<sup>-1</sup>, do óleo de cártamo, não apresentaram atividades genotóxicas e citotóxicas. Nestas doses, não houveram diferenças significativas (p>0,05) na frequência de MNEPC quando comparadas ao grupo controle negativo. Entretanto, a dose de 1.500 mg.kg<sup>-1</sup> foi genotóxica, pois houve diferença significativa quando comparada ao grupo controle negativo.

A relação EPC/ENC, citotoxicidade, para as doses de 500 e 1.000 mg.kg<sup>-1</sup>, do óleo de cártamo, quando comparada ao controle negativo não apresentaram diferença significativa (p>0,05), ou seja, não apresentaram citotoxicidade. A dose de 1.500 mg.kg<sup>-1</sup> foi citotóxica, pois apresentou diferença significativa quando comparada ao controle negativo.



**Figura 07** - Gráfico representando a frequência de micronúcleos em cada 2.000 eritrócitos policromáticos nos testes e controles dos grupos da mutagenicidade.

Os resultados da frequência de MNEPC, média, desvio padrão e relação EPC/ENC para as atividades antigenotóxica e anticitotóxicas estão representados na tabela 03 e figura 08, respectivamente.

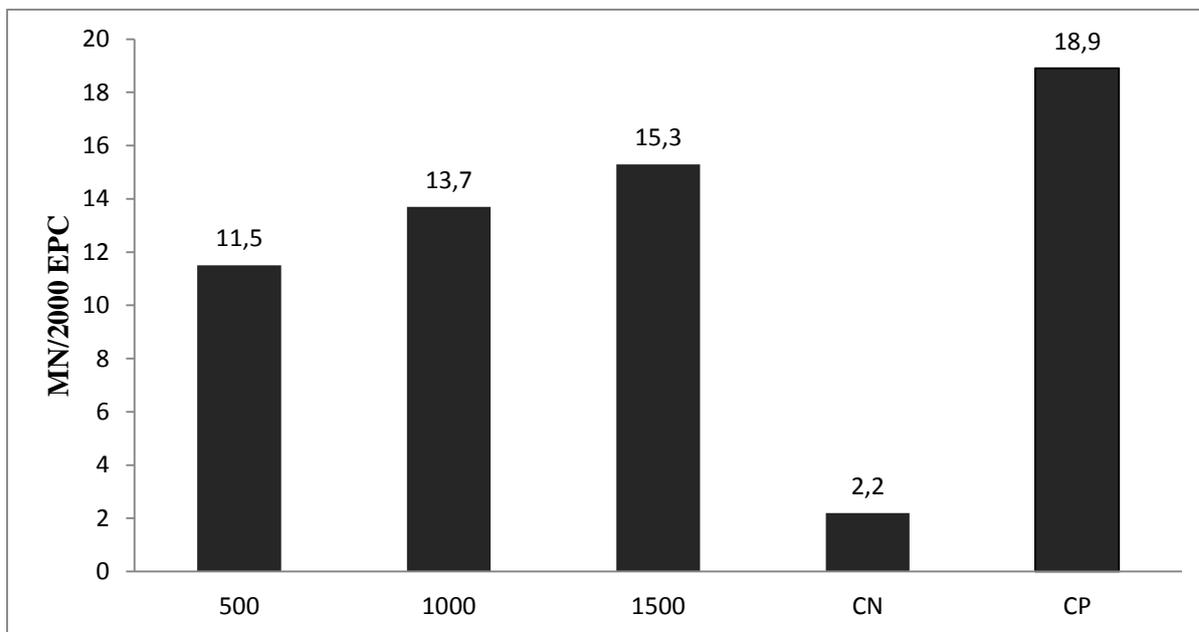
**Tabela 3** – Frequência de MN/2000 EPC e relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com doxorubicina em 03 doses do óleo cártamo e controles.

Doses do óleo cártamo (mg.kg <sup>-1</sup> peso corporal) e doxorubicina (mg.kg <sup>-1</sup> peso corporal)	Nº de animais	Eritrócitos policromáticos micronucleados (MNEPC)		RELAÇÃO EPC/ENC MÉDIA ± DP
		Dados Individuais MN /2000EPC	MN/2000EPC Média ± DP	
500 + 2	6	10-11-15-12-9-12	11.5 ± 2,07 <sup>a</sup>	0.67 ± 0,13 <sup>c</sup>
1000 + 2	6	13-12-15-12-15-15	13.7 ± 1,51 <sup>a</sup>	0.66 ± 0,09 <sup>c</sup>
1500 + 2	6	14-11-18-17-13-19	15.3 ± 3,14 <sup>a</sup>	0.55 ± 0,11 <sup>c</sup>
Óleo de soja (controle negativo) *	6	2-3-2-2-3-1	2.2 ± 0,55	0.92 ± 0,08
Doxorrubicina (controle positivo) **	6	25-17-18-16-24-10	18.3 ± 4,18	0.48 ± 0,11 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>P>0,05; <sup>b</sup>P<0,05; <sup>c</sup>P>0,05; <sup>d</sup>P<0,05. Todos os resultados foram comparados com o Grupo controle positivo.

Na tabela 3 foi observado que as diversas doses (500, 1.000 e 1.500 mg.kg<sup>-1</sup>) do óleo do *Carthamus tinctorius* administradas concomitantemente com doxorubicina (2 mg.kg<sup>-1</sup>) não apresentaram atividades antigenotóxica e nem anticitotóxica, pois quando comparadas aos

eritrócitos policromáticos micronucleados e os respectivos testes, não houve diferença entres eles. O óleo do *Carthamus tinctorius* não interferiu na ação genotóxica da doxorubicina. O mesmo também foi observado na atividade anticitotóxica, o óleo de cártamo não interferiu no efeito citotóxico da doxorubicina.



**Figura 08** - Gráfico representando a frequência de micronúcleos em cada 2.000 eritrócitos policromáticos nos testes e controles dos grupos da antimutagenicidade.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Avaliação da atividade angiogênica/antiangiogênica

A avaliação das atividades angiogênica e antiangiogênica do óleo do *Carthamus tinctorius* foi realizada através de ensaio “*in vivo*” na membrana corioalantoide (MCA) do ovo embrionado galinha.

A MCA é utilizada frequentemente nos testes de angiogênese, sua formação acontece pela fusão do mesoderma somático do córion com o mesoderma esplâncnico do alantóide. Por ser um órgão extra-embriônico amplo e vascularizado, a MCA é empregada com o uso de instigantes e inibidores da angiogênese para avaliar a potencialidade da irritação de solventes (SILVA 2011).

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que a concentração de 1.000 mg/ml do óleo de cártamo exibiu a ampliação da rede vascular nas amostras de MCA testadas em comparação com o controle negativo e inibidor ( $p < 0.05$ ).

Não foram encontrados estudos que avaliaram o potencial angiogênico do óleo de cártamo. Entretanto, nas condições desse experimento, constatou-se a atividade angiogênica do óleo de cartamo, que possui em sua composição cerca de 80% de ácido linoleico (AL) (ROMANELLI; DRAGANO, 2012).

Assim como o *Carthamus tinctorius*, o girassol (*Helianthus annuus L.*) pertence à família asteraceae. Da sua semente é extraído o óleo de girassol, que tem um alto potencial angiogênico, pois auxilia no processo de regeneração tecidual, estimula a neovascularização local, migração celular, proliferação e diferenciação fibroblástica. Pesquisas mostram que o ácido linoleico (AL), presente no óleo da semente de girassol e no óleo de cártamo, contribui para a proliferação celular, e também está agregado ao processo inflamatório, pois possui efeitos de quimiotaxia e estimulação de neutrófilo, além do efeito antibacteriano (FREITAS 2015).

O AL regula o processo de regeneração do tecido que é decorrente da formação de novos vasos sanguíneos e exerce um importante papel quimiotático para macrófagos, que é fundamental na expressão de componentes do sistema fibrinolítico (regulação da produção de colagenase), favorece o desbridamento autolítico no leito da ferida por contribuir com a produção de metaloproteínas, induzindo a granulação e podendo acelerar o processo de cicatrização. De fato, para ocorrer o processo cicatricial é necessário a indução da angiogênese (FERREIRA et al. 2012).

Um importante fator a ser considerado em nossos resultados é que o óleo de cártamo relaciona-se à indução da produção do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). A cascata de sinalização do VEGF é importante na regulação da angiogênese, pois exerce atividade biológica nos receptores transmembrânicos com atividade de tirosina quinase presente nas células do epitélio vascular (DVORAK 2002; LI et al. 2003; FERRARA 2004).

De acordo com Junlatat; Sripanidkulchai (2013) o extrato do *Carthamus tinctorius* (CTE) induz a expressão do VEGF. O mesmo tem sido utilizado como um medicamento tradicional para promover a circulação sanguínea, que está relacionada à ação do VEGF com a função de crescimento do pelo ocasionada pelo CTE, possivelmente através de VEGF. O extrato de CTE pode atuar por indução da proliferação de células epiteliais perto da base do folículo piloso e pode induzir a vasodilatação de vasos sanguíneos do couro cabeludo.

Nas condições desse estudo, o óleo de cártamo mostrou-se um produto com possibilidades promissoras, pois apresentou atividade angiogênica. A atividade angiogênica como mencionada anteriormente é importante na indução de processos de cicatrização de feridas. Nesse aspecto, o desenvolvimento de pomadas para uso tópico será importante para ser avaliada em processos de regeneração tecidual em pesquisas experimentais de ensaios “*in vivo*”. Assim, neste estudo a indução da atividade angiogênica pelo óleo de cártamo torna-se promissora, pois poderá ser utilizado na cicatrização de feridas.

## **6.2 Avaliação das atividades genotóxica/antigenotóxica, citotóxica/anticitotóxica**

Neste estudo, a avaliação das atividades mutagênica e/ou antimutagênica, citotóxica e/ou anticitotóxica do óleo do *Carthamus tinctorius* foi realizada através do teste de micronúcleo em medula óssea hematopoiética de camundongos. Testou-se as doses de 500, 1.000 e 1.500 mg.kg<sup>-1</sup> do óleo de cártamo e controles. Todas as amostras foram comparadas entre si e aos controles positivo (doxorrubicina) e negativo (óleo de soja).

Os resultados do teste do micronúcleo apresentaram a ausência de atividades mutagênica e citotóxica do óleo de cártamo nas doses de 500 e 1.000 mg.kg<sup>-1</sup>. Não foi observado aumento na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos, quando comparados ao grupo controle negativo. Também não houve diferença significativa na comparação da frequência EPC/EPN. Carvalho-Silva et al. (2011) verificaram que um suplemento do óleo de cártamo apresentou atividade antimutagênica, o mesmo continha 77,75g de ácido linoleico conjugado (CLA) por 100g de ácidos graxos totais, onde concentrações de 2% e 4% do composto apresentou tal atividade.

Na dose de 1.500 mg.kg<sup>-1</sup>, os resultados do teste indicaram a presença das atividades mutagênica e citotóxica, constatando diferença significativa em comparação ao grupo controle negativo. Nobakht et al. (2000), trabalhando com extrato do *Carthamus tinctorius* (CTE) identificaram a presença de danos causados na medula óssea dos ratos, decorrentes da utilização de altas concentrações do extrato da planta. Tais achados entram em concordância com outro estudo realizado por Yin et al. (1991), demonstrando que o CTE pode causar aberrações cromossômicas na medula óssea dos animais.

Entretanto, as atividades mutagênica e citotóxica encontradas nos resultados deste estudo firmam com os achados dos pesquisadores acima citados, sendo que os materiais avaliados são diferentes, porém, pertencentes à mesma planta.

Além do *Carthamus tinctorius* outras plantas da família asteraceae como a *Baccharis trimera* e a *Baccharis articulata* também apresentam atividade mutagênica nos seus extratos, é o que mostram os resultados dos estudos de Fachinetto; Tedesco (2009) que avaliaram a atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* e *Baccharis articulata*, sobre o sistema teste de *Allium cepa*. Os extratos aquosos de *B. trimera* e *B. articulata* apresentaram inibição da divisão celular na concentração usual de 15 mg ml<sup>-1</sup>, indicando a ocorrência de atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos, onde aberrações celulares foram encontradas.

Não foram encontrados estudos que testaram o potencial mutagênico e antimutagênico do óleo de cártamo com doses acima de 1.000 mg.kg<sup>-1</sup>. Mas, nas condições desse experimento, foi constatada a atividade mutagênica do óleo. Portanto, o óleo de cártamo em doses elevadas, acima de 1.000 mg deve ser utilizado com cautela pela população em geral. Outros estudos referente à atividade mutagênica encontrada no óleo de cártamo devem ser conduzidos a fim de melhor esclarecer este processo.

## 7 CONCLUSÃO

- O óleo extraído da semente do *Carthamus tinctorius* apresentou atividade angiogênica na MCA;
- Não apresentou atividade mutagênica e nem citotóxica nas doses de 500 e 1.000 mg.kg<sup>-1</sup>.
- Apresentou atividade mutagênica e citotóxica na dose de 1.500 mg.kg<sup>-1</sup>.

## 8 REFERÊNCIAS

ALMEIDA NETO, J. X.; MEDEIROS, F. P. M.; MELO, A. J. M.; et al. 2005. **Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) in vivo.** *Rev Biol Ciênc Terra*, v. 5, p. 41-50.

AMBREEN, H.; KUMAR, S.; VARIATH, M. T.; et al. 2015. **Development of genomic microsatellite markers in *Carthamus tinctorius* L. (safflower) using next generation sequencing and assessment of their cross-species transferability and utility for diversity analysis.** *PLoS one*, v. 10, n. 8, p. 1–22.

AMES, B. N. 1983. **Dietary carcinogens and anticarcinogens.** *Science*, v.221, p. 1256-1264.

ANDERSON, D.; BASARAN, N.; BLOWERS, S. D.; et al. 1995. **The effect of antioxidants on bleomycin treatment in in vitro and in vivo genotoxic assays.** *Mutation Research*, v.329, n.1, p.37-47.

ANTUNES, L. M. G.; ARAUJO, M. C. P. 2000. **Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos.** *Revista de Nutrição*, v. 13, n. 2, p. 81–88.

ARAÚJO, K. M.; OLIVEIRA, A. K. C.; COSTA, G. B. 2002. **Estudo comparativo técnico e econômico de diferentes óleos vegetais brasileiros para produção de biocombustível.** *Proceedings of the 4th Encontro de Energia no Meio Rural*.

ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINNER, R. P. C. 2005. **Plantas Medicinais de Uso Caseiro - Conhecimento Popular e Interesse por Cultivo Comunitário.** *Revista Espaço para a Saúde*, v. 6, n. 2, p. 1–6.

AUED-PIMENTEL, S.; KUMAGAI, E. E.; KUS, M. M. M.; et al. **Ácidos graxos trans em óleos vegetais refinados poli-insaturados comercializados no estado de São Paulo, Brasil.** *Ciênc Tecnol Aliment*, v. 29, n. 3, p. 646-51.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C. G.; et al. 1984. **Sistemática de Angiospermas do Brasil.** Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, v. 6, n. 2, p. 1-6.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. D.; et al. 2005. **Perfil De Sensibilidade De Bactérias Frente a Óleos Essenciais De Algumas Plantas Do Nordeste Do Brasil.** *Infarma*, v. 17, n. 3/4, p. 80–83.

BLAAUWGEERS, H. G.; HOLTKAMP, G. M.; RUTTEN, H.; et al. 1999. **Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation.** *American Journal of Pathology*, v. 155, n. 2, p. 421-428.

BOETTCHER, M.; GLOE, T.; WIT, C. 2010. **Semiautomatic Quantification of Angiogenesis.** *Journal of Surgical Research*, v. 162, n. 1, p. 132-139.

BOREK, C. 1996. **The role of nutritional factors in cellular protection against DNA damage, altered gene expression and malignant transformation.** *Mechanisms of DNA Damage and Repair: Implications for carcinogenesis and risk assessment*, v. 38, p. 557-562.

BOZAN, B.; TEMELLI, F. 2008. **Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils.** *Bioresource Technology*, v. 99, n. 14, p. 6354–6359.

BREMER, K. 1994. **Major clades and grades of the Asteraceae.** In: *Compositae: systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew*, (D.J.N. Hind & H.J. Beentje, eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, v.1, p.1-7.

BÜCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. 2006. **Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno.** *Acta Amazonica*, v. 36, n. 3, p. 357–364.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. 2008. **Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil.** *Gazeta médica da Bahia*, v. 78, n. 1.

CANCELLI, R. R., EVALDT, A. C. P., BAUERMAN, S. G.; et al. 2010. **Catálogo palinológico de táxons da família Asteraceae Martinov, no Rio Grande do Sul, Brasil.** *Iheringia, Série Botânica*, v. 65, n. 2, p. 201-280.

CAO, Y. U., FU, Z. D., WANG, F.; et al. 2005. **Anti-angiogenic activity of resveratrol, a natural compound from medicinal plants.** *Journal of Asian natural products research*, v. 7,

n. 3, p. 205–213.

CAPELA, F.S. 2001. **Avaliação de Biomarcadores**. *Dept. de Biologia, Universidade de Évora*.

CARVALHO-SILVA, L. B. D., OLIVEIRA, M. D. V., KONICHI.; et. al. 2011. **Evaluation of mutagenic/antimutagenic activity of conjugated linoleic acid in mice by micronucleus test**. *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 62, p. 13672–13679.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. 1998. **Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade**. *Química Nova*, v. 21, n. 1, p. 99–105.

CHAVES, D. A. et al. 2016. **Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa do barbatimão (Stryphnodendron adstringens)**. *Rev. bras. plantas med*, v. 18, n. 2, p. 524-530.

COLOMBO. Introdução à fitoterapia: utilizando adequadamente as plantas medicinais. Herbarium. Ltda. 92p. 2008.

DA, A.; RODRIGUES, S. Com Possíveis Propriedades Mutagênicas Pelos Acadêmicos Do Curso De Nutrição Do Centro Universitário De Maringá-Pr Assessment of Consumption of Food Containing Additives With Possible Multigenetic Properties By the Students of the Nutrition Course At Univ. v. 6, p. 126–137, 2004.

DE MORAIS, L. A. S. 2009. **Influência Dos Fatores Abióticos Na Composição Química Dos Óleos Essenciais**. *Horticultura Brasileira*, v. 27, n. 2, p. 4050–4063.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; et al. 1999. **Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs**. *Life Science*, v. 65, p. 337-353.

DRAGANO, N. R. V.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. 2012. **Redução do peso e da glicemia resultante da suplementação de ácido linoleico conjugado e fitosteróis à dieta hiperlipídica de camundongos**. *Ciência Rural*. p. 374–380.

DVORAK, H. F. 2002. **Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy.** *Journal of clinical oncology*, v. 20, n. 21, p. 4368-4380.

EMONGOR, V. 2010. **Safflower (Carthamus tinctorius L.) the underutilized and neglected crop: a review.** *Asian Journal of Plant Sciences*, v.9, n.6, p. 299-306.

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. 2009. **Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de Baccharis trimera (Less.) AP de Candolle e Baccharis articulata (Lam.) Pers.(Asteraceae) sobre o sistema teste de Allium cepa.** *Revista brasileira de plantas medicinais*, v. 11, n. 4, p. 360-367.

FÃO, F.; ZAN, R. A.; BRONDANI, F. M. M.; et al. 2012. **Análise do Potencial Mutagênico da Seiva da Casca de Croton lechleri (Mull. Arg), no Estado de Rondônia, Amazônia Ocidental.** *SaBios: Revista de Saúde e Biologia*, v. 7, n. 1, p. 91-98.

FÉLIX-SILVA, J.; TOMAZ, I. M.; SILVA, M. G.; et al. 2012. **Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 14, n. 3, p. 548-555.

FERRARA, N. 2004. **Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress.** *Endocrine Review*, v. 25, n. 4, p. 581-611.

FERREIRA, A. M. et al. 2012. **Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional.** *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 46, n. 3, p. 752-760.

FLORES, M.; YAMAGUCHI, M. U. 2008. **Teste do Micronúcleo: Uma Triagem Para Avaliação Genotóxica.** *Revista Saúde e Pesquisa*, v. 1, n. 3, p. 337-340.

FOLKMAN J. 1971. **Tumor angiogenesis: therapeutic implications.** *New England Journal of Medicine*. v. 285, n. 21, p. 1182-1186.

FOLKMAN, J.; INGBER, D. 1992. **Inhibition of angiogenesis.** *Seminars in cancer biology*, v.3, n.2, p.89-96.

FREITAS, I. S.; PRADO, L. G. 2015. **Utilização do ultrassom terapêutico e do óleo de semente de girassol na cicatrização de feridas cutâneas em equinos.** *Revista Científica da FEPI*, v. 8, n. 2.

GALANT, M. B.; SANTOS, R. F.; SILVA, M. A. 2015. **Melhoramento de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.).** *Acta Iguazu*, v.4, n.1, p. 14-25.

GILBERT, N. W.; TUCKER, T. C. 1967. **Growth, yield, and yield components of safflower as affected by source, rate and time of application of nitrogen.** *Agronomy Journal, Madison*, v.59, p.54–55.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. 2007. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374–381.

GONZALEZ, R. P.; LEYVA, A. M.; RAMON, A. B. 2000. **Método para o estudo in vivo da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho.** *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 15, n. 3, p. 168-173.

GUINAZ, M., MILAGRES, R. C. R. M., PINHEIRO-SANT'ANA, H. M., et al. 2009. **Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos.** *Quím Nova*, v. 32, n. 8, p. 2098-103.

HAN, X.; CHENG, L.; ZHANG, R.; et al. 2009. **Extraction of safflower seed oil by supercritical CO<sub>2</sub>.** *Journal of Food Engineering*, v. 92, n. 4, p. 370-376.

HEDDLE, J.A. 1973. **A rapid in vivo test for chromosomal damage.** *Mutation. Res.* 18: 187-190, 1973.

HIND, D. J. N.; BEENTJE, H. J. 1996. **Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994.** *Royal Botanic Gardens, Kew.* v.1, p.621-626.

JOHNSON, L. V.; LEITNER, W. P.; STAPLES, M. K.; et al. 2001 **Activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration.** *Experimental eye research*, v. 73, n. 6, p. 887-896.

JUNLATAT, J.; SRIPANIDKULCHAI, B. 2014. **Hair growth-promoting effect of *Carthamus tinctorius* floret extract.** *Phytotherapy Research*, v. 28, n. 7, p. 1030–1036.

KAFFKA, S. R.; KEARNEY, T. E. 1998. **Safflower Production in California.** Oakland. *Univeristy of California Agriculture and Natural Resources*. p. 31. (Publication n°. 21565).

KARAMYSHEVA, A. F. 2008. **Mechanisms of Angiogenesis.** *Biochemistry*, v. 73, n. 7, p. 751-762.

KEON, R. 2004. **Safflower production on the Canadian Prairies.** *Lethbridge: Canada*.

KHAN, T. H.; PRASAD, L.; SULTANA, A.; et al. 2005. **Soy isoflavones inhibits the genotoxicity of benzo (a) pyrene in Swiss albino mice.** *Human & Experimental Toxicology*, v. 24, n. 3, p. 149-155.

KOUTROUBAS, S. D.; PAPAKOSTA, D. K.; DOITSINIS, A. 2008. **Nitrogen utilization efficiency of safflower hybrids and open-pollinated varieties under Mediterranean conditions.** *Field Crops Research*, v. 107, n. 1, p. 56-61.

KRISHNAN, P. 2006. **The scientific study of herbal wound healing therapies: Current state of play.** *Current Anaesthesia & Critical Care*, v. 17, n. 1–2, p. 21–27.

KULEKCI, M.; POLAT, T.; OZTURK, E. 2009. **The determination of economically optimum nitrogen dose in safflower production under dry conditions.** *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, v. 15, n. 4, p. 341–346.

KUMAR, S. R.; VALLIKANNAN, B. 2010. **Carotenoid composition and retinol equivalent in plants of nutritional and medicinal importance: Efficacy of  $\beta$ -carotene from *Chenopodium album* in retinol-deficient rats.** *Food Chemistry*, v. 19, p. 1584-1590.

LAXOR, L.; MIGUEL, M.; PAULA, J. 2013. **Avaliação da toxicidade aguda e da atividade cicatrizante dos extratos etanólicos das folhas e raízes da *Memora nodosa* (Silva Manso) Miers (Bignoniaceae).** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 3, p. 423–430.

LI, J.; ZHANG, Y.P.; KIRSNER, R.S. 2003. **Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix.** *Microscopy research and technique*, v. 60, n. 1, p. 107-114.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, J. V.; et al. 2002. **Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares.** *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429–438.

MANEESAI, P.; PRASARTTONG, P.; BUNBUPHA, S.; et al. 2016. **Synergistic Antihypertensive Effect of *Carthamus tinctorius* L. Extract and Captopril in I-NAME-Induced Hypertensive Rats via Restoration of eNOS and AT1R expression.** *Nutrients*, v. 8, n. 3, p. 122.

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

MONDIN, C.A, Cláudio Augusto Modin 1996. *A tribo Mutiseae Cass. (Asteraceae) sensu Cabrera, no Rio Grande do Sul e suas relações biogeográficas.* Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

NAKAJIMA, J. N.; SEMIR, J. 2001. **Asteraceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil.** *Revista Brasileira de Botânica*, v. 24, n. 4, p. 471–478.

NIEMISTO, A.; DUNMIRE, V.; YLI-HARJA, O. et al. 2005. **Robust quantification of in vitro angiogenesis through image analysis.** *IEEE Transactions on Medical Imaging*, v. 24, n. 4, p. 549-553.

NOBAKHT, M.; FATTAHI, M.; HOORMAND, M.; et al. 2000. **A study on the teratogenic and cytotoxic effects of safflower extract.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, n. 3, p. 453–459.

OBA, G. C.; GONELI, A. L.; FILHO, C. P.; et al. *Alguns testes de velocidade de germinação em sementes de *Carthamus tinctorius* L. para a avaliação do efeito do nível de água do substrato.* In: 17º WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DO MATO GROSSO DO SUL/7º EMPÓRIO DA AGRICULTURA FAMILIAR, 2015.

Oplinger, E. S., Oelke, E. A., Kaminski, A. R., et al. Safflower. *Alternative Field Crops*

Manual, 8p, 1992. Disponível em<[www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/safflower.html](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/afcm/safflower.html)>. Acessado em: 23 de fevereiro de 2017.

PEREIRA CAB. 1992. **Plantas tóxicas e Introdução na veterinária**. Editora UFG-Go.

PINHO, D. S. D.; STURBELLE, R. T.; MARTINO-ROTH, M. D. G.; et al. 2010. **Avaliação da atividade mutagênica da infusão de baccharis trimera (Less.) DC. em teste de allium cepa e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos**. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, n. 2, p. 165–170.

RATES, S.M.K. 2001. **Plants as source of drugs**. *Toxicon, Amsterdam*, v. 39, n. 5, p. 603-613.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E. K. 2003. **A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana**. *Mutagênese Ambiental Canoas Ulbra*, p.21–28.

ROSSETO, R. E., SANTOS, R. F., BASSEGIO, D., et al. 2012. **Efeito da secagem na extração de óleos em plantas com potencial energético**. *Acta Iguazu*, v. 1, p. 69-77.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.M.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R., orgs. 2000. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2.ed. Florianópolis. UFSC; Porto Alegre: UFRGS, cap.15, p.291-320.

SCHMID, W. 1975. **The micronucleus test**. *Mutatio Research*, 31: p. 9-15.

SENGER, D. R., GALLI, S. J., DVORAK, A. M., 1983. et al. **Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid**. *Science*. v. 219, n. 4587, p. 983-985.

SHIMA, D. T.; ADAMIS, A. P.; FERRARA, N.; ET AL. 1995. **Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen**. *Molecular Medicine*. v. 1, n. 2, p. 182.

SILVA, C. J. 2013. **Caracterização agrônômica e divergência genética de acessos de cártamo.** (Doutorado em Agronomia-Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade estadual Paulista, Botucatu. Tese. p. 51.

SILVA, J. E. S. D. 2011. **Análise fractal da vascularização da membrana corioalantóide de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetidas a dietas enriquecidas com ácidos graxos em diferentes concentrações.** p. 103.

STURBELLE, R. T.; PINHO, D. S. D.; RESTANI, R. G.; et al. 2010. **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.

TAKAHASHI, C. S., et al **Teste do micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo.** Disponível na Internet: <http://www.sbmcta.org.br/index.php>.

TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; et al. 2003. **Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vivo and in vitro assays.** *Genetics and Molecular Biology*, v. 26, n. 4, p. 551-555.

VALIATTI, F. B.; CRISPIM, D.; BENFICA, C.; et al. 2011. **The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis and diabetic retinopathy.** *Arquivos Brasileiros de Encocrinologia e Metabologia*, v. 55, n. 2, p. 106-113.

VAN DER SCHAFT, T. L.; MOOY, C. M.; DE BRUIJN, W. C.; et al. 1993. **Early stages of age-related macular degeneration: an immunofluorescence and electron microscopy study.** *British journal of ophthalmology*. v. 77, n. 10, p. 657-661.

VARANDA, E. A. 2006. **Atividade mutagênica de plantas medicinais.** *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 27, n. 1, p. 1–7.

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

VEIGA-JUNIOR, V.F. 2008. **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.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 308-13.

VELASCO, L.; FERNANDEZ-MARTINEZ, J. M. 2002. **Progress in breeding modified tocoferol content and composition in safflower.** *Sesame Safflower Newslett.* v. 17, p. 98–101.

WATERS, M. D.; STACK, H. F.; JACKSON, M. A. et al. 1996. **Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data.** *Mutation Research, Amsterdam,* v. 350, n.1, p. 109-129.

WILTING, J.; CHRIST, B.; WEICH, H. A. 1992. **The effects of growth factors on the day 13 chorioallantoic membrane (CAM): a study of VEGF 165 and PDGF-BB.** *Anatomy and embryology,* v. 186, n. 3, p. 251-257.

W.H.O. World Health Organization. 1993. International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles. Geneva.

XUE-JUN, Y.; DE-XIANG, L.; HECHUAN, W.; et al. 2001. **A study on the mutagenicity of 102 raw pharmaceuticals used in Chinese traditional medicine.** *Mutation Research/Genetic Toxicology,* v. 260, n. 1, p. 73–82.