



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

KÊNIA DOS SANTOS OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA E
ANTIANGIOGÊNICA, GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA E
MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DA SOLUÇÃO AQUOSA DE
*CAESALPINIA FÉRREA (TUL.) MARTIUS (Jucá)***

**GOIÂNIA
2014**

KÊNIA DOS SANTOS OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA E
ANTIANGIOGÊNICA, GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA E
MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DA SOLUÇÃO AQUOSA DE
CAESALPINIA FÉRREA (TUL.) *MARTIUS* (Jucá)**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis

**GOIANIA
2014**

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

Oliveira, Kênia dos Santos.
O48a Avaliação das atividades angiogênica e antiangiogênica,
genotóxica e antigenotóxica e mutagênica e antimutagênica da
solução aquosa de *Caesalpinia férrea* (Tul.) martius (Jucá)
[manuscrito] / Kênia dos Santos Oliveira. – 2014.
80 f. : il. ; graf. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de
Goiás, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, 2014.
“Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis”.
Bibliografia.

1. Neovascularização. 2. Mutagênese. 3. Plantas medicinais.
I. Título.

CDU 615.2:582.572.7(043)

“As plantas medicinais brasileiras não curam apenas, fazem milagres.”

Von Martius

“De uma simples folha faço um chá, deste um remédio. Do remédio, obtenho uma cura. Quantos milagres estão guardados na Natureza!”

Jacob Melo

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais,

Aldenora e Vilmar (*in memorian*) pela vida, coragem, determinação. Para o meu pai que já não está mais entre nós dedico a frase de Victor Hugo que diz: Amar é saborear nos braços de um ente querido a porção de céu que Deus depôs na carne. Mãe amada, muito obrigada pelos ensinamentos, pela paciência e, principalmente, por acreditar em mim. Meu eterno respeito e amor!

Aos meus avós e tia,

A minha avó Ana e meu avô Valdivino (*in memorian*), minha tia Lucimar pelo incentivo durante toda a minha vida, por ter me criado, seus exemplos me ensinaram a estudar e a trabalhar com respeito, dignidade, reconhecendo o valor do trabalho, a importância da dedicação e perfeição para a realização pessoal e profissional. Agradeço imensamente à Deus por ter convivido com vocês, ao meu avô Valdivino por ter sido um avô/pai presente. Pela nossa convivência harmônica e apoio incondicional. Tudo que sou devo à vocês. Esse trabalho é nosso.

Aos meus irmãos,

Kemerson e Vanyana, pelo constante incentivo, amor e carinho. Obrigada por existirem.

Á minha pequenina filha Ana Elisa, herança de Deus em minha vida, manifestação do amor infinito e verdadeiro. Seu sorriso me alegra diariamente, deixando a minha vida mais feliz, você me surpreende com tanta ternura me mostrando a cada dia o maior amor do mundo. Mamãe te ama!

Á Família Martins, na pessoa do Sr. Edson e Sra. Dejandira, seus filhos Dejjane, Kassia, João Paulo, Gustavo, Erinéia e Edson Rodrigo pela confiança e apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis, pela oportunidade, dedicação, sabedoria, otimismo, benevolência, espírito científico e por me fazer exercitar a paciência, principalmente nos momentos em que não obtínhamos os resultados esperados nos experimentos. Sua persistência e empolgação nortearam o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada pela confiança depositada em mim.

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos àqueles que diretamente e indiretamente contribuíram para esta realização.

Primeiramente a Deus, por me dar força e paciência para seguir.

À minha família pela confiança e ensinamentos que fizeram de mim o que eu sou hoje;

À Pontifícia Universidade Católica de Goiás, a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação. Ao Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, na pessoa da Profa. Dra. Maira Barbieri e do Prof. Dr. Nelson Jorge da Silva Junior. Ao Corpo Docente pelos ensinamentos e ao Secretário Jader pelo atendimento cordial e atencioso;

As colegas do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, e ao Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos – MCAS da PUC/GO. Agradeço a excelente convivência e as trocas de informações técnico-científicas.

Às alunas Mariah, Raphaela e Maria Alice pelo apoio na realização experimento;

Ao UNIVAG - Centro Universitário de Várzea Grande pelo auxílio financeiro.

Aos colegas e amigos do UNIVAG – Centro Universitário de Várzea Grande pelo incentivo e pela agradável convivência. Em especial aos docentes Yeda Regina, Aline Bianchi, Adriana Magalhães, Lucia Helena, Luzia Helena, Laura Furtado, Elisabet Aguirre, Omar Zina, Luiz Duarte, Ronaldo Baumgartner, Isabel Gimenez, Dr. Dráuzio e Flavio Foguel pelos ensinamentos, postura ética e profissional; aos membros da Comissão Própria de Avaliação pela convivência diária. Por fim, agradeço aos meus queridos amigos Graciela Oyamada, Jovelina Francisca, Claudia Cristina e Flávio Gatti, pela alegria constante, pela paciência e ouvido atento nos momentos de desespero e desânimo.

Aos companheiros do Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese da Universidade Federal de Goiás, Prof. Ms. Cristiene Carneiro, Dra. Lee Chen Chen e Jefferson Hollanda pela acolhida, colaboração e dedicação com as atividades desenvolvidas no laboratório. Aprendi muito com vocês.

À banca de qualificação composta pelos Professores Doutores Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis, Flávio Monteiro Ayres, Vera Aparecida Saddi e Fátima Mrué pelas sugestões, generosidade e a oportunidade de interlocução sobejamente significativa. Ao Prof. Flávio por brindar-me com uma correção crítica e apropositada. Vocês foram determinantes para a qualificação deste trabalho. Rendo-lhe meu agradecimento.

À banca de defesa composta pelos Professores Doutores Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis, Prof.^a Dra. Fátima Mrué, Prof.^a Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura e Prof.^o Dr. Wilson de Melo Cruvinel por compartilhar seus conhecimentos fomentando o desenvolvimento da ciência.

RESUMO

Caesalpinia férrea Martius ex. Tul var. *férrea* é uma árvore que pertence à família Leguminosae, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, cresce em todo o Brasil nas regiões Norte e Nordeste, sendo conhecida como Pau-ferro, Jucá, Ibirá-obi, Imirá-itá, Muirá-obi. Algumas das propriedades terapêuticas de *Caesalpinia férrea* têm sido descritas e incluem tratamento de ferimentos e contusões, alívio de tosse crônica e asma. Os frutos têm sido usados no tratamento de diabetes e na prevenção do câncer, as raízes são utilizadas como antipiréticas e antidiarréicas, e a decocção da madeira é anticatarral e cicatrizante, a casca do caule é usada ainda como descongestionante, no tratamento de enterocolite e diarreia, mostrando ainda possíveis benefícios no sistema cardiovascular dos usuários. O presente trabalho avaliou as atividades angiogênica/antiangiogênica, genotóxica/antigenotóxica e mutagênica/antimutagênica da solução aquosa da *Caesalpinia Férrea* (Tul) *martius* (Jucá) utilizando testes laboratoriais “*in vivo*”, como modelo experimental a membrana corioalantóidea do ovo embrionado de galinha, o Teste de Mutagenicidade de Ames em *Salmonella typhimurium* (cepas TA 100 e o Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongos. Nossos resultados indicaram que a solução aquosa do fruto do jucá na concentração de 20 g/mL promoveu o processo angiogênico na membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha. O teste de Micronúcleo indicaram a ausência de atividades mutagênica e citotóxica na dose de 200,0 mg.kg⁻¹ por peso corpóreo, uma vez que não houve aumento na frequência de micronúcleo em eritrócitos policromáticos, quanto comparados ao grupo controle negativo. Já no Teste de Mutagenicidade o resultados mostraram que a solução do jucá não foi mutagênica para a *Salmonella typhimurium* cepa TA100 em nenhuma das doses testadas.

Palavras-chave: *Caesalpinia Ferrea*, Angiogênese, Membrana corioalantoídea, Genotóxicidade, Mutagênese, Teste de micronúcleo, Teste de Mutagenicidade AMES.

ABSTRACT

Caesalpinia iron Martius ex. Tul var. *iron* is a tree that belongs to the family Leguminosae, distributed in tropical and subtropical regions, grows throughout Brazil in the North and Northeast regions, known as ironwood, Jucá, Ibirá-obi-ita Imirá, Muira-obi. Some of the therapeutic properties of *Caesalpinia iron* have been described and include treatment of wounds and bruises, relief from chronic cough and asthma. The fruits have been used in the treatment of diabetes and in the prevention of cancer, the roots are used as antipyretic and antidiarrheal, and the decoction is anticatarral timber and healing the stem bark is still used as a decongestant for the treatment of diarrhea and enterocolitis, still showing possible benefits on the cardiovascular system of users. This study evaluated the angiogenic / antiangiogenic genotoxic / mutagenic antigenotoxic and / antimutagenic of aqueous solution of *Caesalpinia Iron* (Tul) *martius* (Juca) using laboratory tests "in vivo", as an experimental model to chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs activities, Test for mutagenicity in the Ames *Salmonella typhimurium* (strains TA 100 and the micronucleus test in mouse bone marrow. Our results indicated that the aqueous solution of the fruit of jucá concentration of 20 g / ml promoted the angiogenic process in the chorioallantoic membrane of embryonated hen eggs. micronucleus test indicated the absence of mutagenic and cytotoxic in the dose of 200.0 mg.kg⁻¹ body weight per activity, since there was no increase in the frequency of micronucleus in polychromatic erythrocytes, as compared to the group negative control. you Mutagenicity Test results showed that the solution jucá was not mutagenic to *Salmonella typhimurium* TA100 strain in any of the doses tested.

Keywords: *Caesalpinia Ferrea*, Angiogenesis, Membrane chorioallantoic, genotoxicity, Mutagenesis, micronucleus test, Ames mutagenicity test.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Percentagem da vascularização da membrana corionlatoidea do ovo embrionado de galinha após tratamento com solução aquosa da *Caesalpina Ferrea* e os diferentes controles54

Tabela 2. Frequência de MNEPC e relação entre EPC/ENC após 24 horas do tratamento com a solução de *Caesalpina férrea*57

Tabela 3 – Frequência de MNEPC e relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com MMC e solução de *Caesalpina férrea*57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Caesalpinia férrea</i> – visão panorâmica da árvore com galhos e folhas verdes.....	28
Figura 2 – <i>Caesalpinia férrea</i> – Detalhes dos galhos e da fava	29
Figura 3 – <i>Caesalpinia férrea</i> – Detalhes dos galhos e flores	29
Figura 4 – <i>Caesalpinia férrea</i> – Detalhes das flores.....	30
Figura 5 – <i>Caesalpinia férrea</i> – Detalhes do fruto maduro	31
Figura 6 – Observação de eritrócitos com MNs (indicados pelas setas) em esfregaço de sangue da medula óssea de camundongo. ENC – Eritrócito normocromático. EPC – Eritrócito policromático	41
Figura 7 – Processo de maturação normal das células da linhagem eritrocitária.....	41
Figura 8 – Formação da célula micronucleada contendo um fragmento cromatídico acêntrico. A indução ao dano estrutura cromossômico na interfase (a), resultando na formação de um fragmento cromatídico sem centrômero (acêntrico), pode ser visualizada quando os cromossomos são condensados na metáfase (b) da mitose. A reconstituição da membrana nuclear ao redor do fragmento cromatídico produz um micronúcleo (c), o qual pode ser quantificado na célula filha formada após a divisão (e)	42
Figura 9A – Detalhes da abertura de 1cm de diâmetro na casca do ovo, apresentação da CAM vascularizada obtida com câmera digital Sony Cyber-shot – 14.1 mega pixes em 20/10/2013. A figura 9B – visão da rede vascular da CAM no 13º dia desenvolvimento, bem como, o papel filtro que foi embebecido com a substancia teste ou controle. Papel filtro colocado próximo a um vaso sanguíneo calibroso da CAM. Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-shot – 14.1 mega pixes em 17/12/2013.	42
Figura 10 - As secções de parafina corados com hematoxilina-eosina.....	55
Figura 11 – Nota-se a presença de tecido conjuntivo, elementos inflamatórios e vasos sanguíneos bem formados que exibem na luz vascular eritroblastos	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

MAC	Membrana Corioalantoide do Ovo Embrionado de Galinha
GO	Goiás
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial da Saúde
MMC	Mitomicina C
a.C.:	Antes de Cristo
ANVISA:	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
IBGE:	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
°C:	Graus Celsius
mm:	Milímetro
DPPH:	1,1-Difenil-2-Picril-Hidrazina
DNA:	Ácido Desoxirribonucleico
RNA:	Ácido Ribonucleico
<i>S. typhimurium:</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>His:</i>	Histidina
EPC:	Eritrócito(s) Policromático(s)
EPCMN:	Eritrócito(s) Policromático(s) Micronucleado(s)
ENC	Eritrócito(s) Normocromático(s)
FHE:	Fração hexânica
FAE:	Fração acetato de etila
FHA:	Fração hidroalcoólica
MMG	Meio Mínimo Glicosado
µg:	Micrograma
mg:	Milígrama
mM:	Milimolar
mL:	Mililitro
RM	Razão de mutagenicidade
MEVB:	Meio Vogel-Bonner
i.p.:	Intraperitoneal
p.c.:	Peso corpóreo
DL50:	Dose Letal 50%
COBEA:	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
rpm:	Rotações por minuto
ANOVA:	Análise de Variância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2.REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 Histórico do uso de plantas medicinais.....	21
2.2 Cerrado.....	24
2.3 Caesalpinia Férrea Martius ex. Tul. var.....	26
2.4 Angiogênese e antiangiogênese.....	32
2.5 Mutação, genotoxicidade e câncer.....	33
2.6 Antimutagenicidade e Antigenotoxicidade.....	37
2.7 Teste de Mutagenicidade de AMES.....	38
2.8 Teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo.....	39
3. OBJETIVOS.....	44
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4.1. Avaliação da atividade angiogênica na MCA.....	45
4.1.2. Ovos embrionados de galinha.....	45
4.1. 3. Drogas e reagentes.....	45
4.1.4 Procedimento experimental.....	45
4.1.5 Obtenção da imagem e mensuração automatizada da rede vascular.....	46
4.1.6 Análise de dados.....	47
4.2 Teste do Micronúcleo em MOH do camundongo.....	47
4.2.1 Solução aquosa da Caesalpinia Férrea (Tul) martius (Jucá).....	47
4.2.2 Animais.....	48
4.2.3 Aprovação em Comitê de Ética.....	49
4.2.4 Procedimento experimental Teste do Micronúcleo em MOH do camundongo.....	49
4.2.5 Análise e citogenética.....	50
4.2.6 Análise e estatística.....	50
4.3 Teste de Mutagenicidade de Ames em cepas de Salmonella typhimurium.....	51
4.3.1 Cepas Bacterianas.....	51
4.3.2 Meios de cultura e soluções.....	51
4.3. 3 Controles.....	51
4.3.4 Procedimento experimental.....	51
4.3.5 Análise dos resultados.....	52
5. RESULTADOS.....	54
5.1 Atividade angiogênica e antiangiogênica.....	54
5.2 Análise histológicas.....	55
5. 3 Teste do Micronúcleo em MOH Óssea de camundongos.....	56

5.4 Teste de Mutagenicidade de Ames em cepa de <i>Salmonella typhimurium</i>	58
6. DISCUSSÃO.....	59
6.1 Atividade angiogênica.....	59
6.2 Atividade genotóxica e antigenotóxica.....	60
7. CONCLUSÕES.....	63
REFERÊNCIAS.....	64

APÊNDICE A

PROCOLO – TESTE DO MICRONÚCLEO EM MOH DO CAMUNDONGO

APÊNDICE B

PROCOLO – TESTE DE MUTAGENICIDADE DE AMES EM CEPAS DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

ANEXO

APROVAÇÃO COMITÉ DE ÉTICA

1. INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos, as plantas são usadas pelo homem como alimento e no tratamento de doenças (BENDAZZOLI, 2002). Neste sentido, a origem do conhecimento sobre as propriedades medicinais das plantas confunde-se com própria história (NOVAIS et al., 2003; COWAN, 1999; CALIXTO, 2000). Estudos com fósseis humanos revelam que a utilização de plantas medicinais ocorre há aproximadamente 60.000 anos (FARNSWORTH, 2001).

Por séculos, as plantas foram a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas representaram a fonte principal de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas e 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizados na terapia moderna (HOSTETTMANN et al., 2003).

Cerca de 75% da população mundial utiliza as plantas medicinais no tratamento de enfermidades, devido às características desejáveis associadas ao uso, como eficácia, baixo risco, reprodutibilidade e constância de qualidade. Elas têm sido utilizadas na assistência primária à saúde com excelentes resultados em muitos países da América Latina, Europa e extensamente na Ásia, em razão da presença de substâncias ativas como taninos, alcaloides, compostos fenólicos, óleos essenciais e vitaminas (VIEIRA et al., 2007).

Fatores como os crescentes aumentos dos preços das drogas convencionais, seus efeitos colaterais, novas formas de doenças passíveis de tratamento através de medicamentos ditos “naturais” e as dificuldades relacionadas ao acesso aos serviços de saúde pública, tem contribuído para o aumento no consumo das plantas medicinais (MARODIN, 2001).

Nos dias de hoje, nota-se um retorno do interesse pelas plantas medicinais, devido á grande procura por terapias alternativas. Isto se deve principalmente à ineficiência de alguns produtos sintéticos e à busca da população por tratamento

menos agressivos ao organismo (RIBEIRO, et al., 2005).

No Brasil, o uso de plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena. O Ministério do Meio Ambiente estima que populações indígenas brasileiras dominem a aplicação medicinal de pelo menos 1.300 plantas da região, os conhecimentos adquiridos a respeito do uso de determinada planta são transmitidos de geração a geração pelas comunidades tradicionais, e são eles que muitas vezes determinam a elaboração de estudos farmacológicos e fitoquímicos. (VEIGA-JUNIOR, 2008).

Além da influência cultural, o amplo uso dessas plantas no Brasil se deve também à grande diversidade genética vegetal existente no país. Já são mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000, o que tem provocado um crescente interesse pelo desenvolvimento de novos fitoterápicos e fitofármacos (SIMÕES et al., 2002).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade, em torno de 15 a 20% do total mundial, com destaque para as plantas superiores, nas quais detém aproximadamente 24% da biodiversidade. Entre os elementos que compõem a biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. Além de seu uso como substrato para a fabricação de medicamentos, as plantas são também utilizadas em práticas populares e tradicionais como remédios caseiros e comunitários, processo conhecido como medicina tradicional. Além desse acervo genético, o Brasil é detentor de rica diversidade cultural e étnica que resultou em um acúmulo considerável de conhecimentos e tecnologias tradicionais, passados de geração a geração, entre os quais se destaca o vasto acervo de conhecimentos sobre manejo e uso de plantas medicinais. (BRASIL, 2006).

Entre os biomas que o Brasil possui, o Cerrado é um dos que exercem maior influência na medicina popular. Ele ocupa a segunda maior zona vegetal do país (abrangendo 120 milhões de hectares). As partes vegetativas (raízes, caules e folhas) de suas plantas são as mais utilizadas pela população. O uso delas é feito principalmente através de chás e infusões, ou por aplicações externas nos processos de banho e gargarejos (BRASIL, 2006).

Os medicamentos fitoterápicos são preparações farmacêuticas (extratos, tinturas, pomadas e cápsulas) de ervas medicinais, obtidas a partir de uma ou mais plantas, que podem ser utilizadas para o tratamento de várias doenças. Usualmente, as substâncias ativas responsáveis por seu efeito farmacológico são desconhecidas; Dentre as inúmeras vantagens dos fitoterápicos, estão o largo uso terapêutico, o baixo custo e a grande disponibilidade para a população de baixa renda (CALIXTO, 2001).

Apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foi estudada em busca de compostos bioativos, e 1.100 espécies foram avaliadas em suas propriedades medicinais (SIMÕES et al., 2002). Sendo assim, muitas plantas que a população utiliza de forma terapêutica ainda não tiveram sua eficácia e riscos comprovados cientificamente.

Dentre as plantas que a população utiliza com finalidade terapêutica no Brasil, cujas propriedades farmacológicas e fitoquímicas ainda não foram totalmente esclarecidas, destacamos a *Caesalpinia Férrea Martius ex Tul. var. Férrea* é uma árvore que pertence à família Leguminosae – Caesalpinioideae (Caesalpinaceae) que cresce em todo o Brasil (BRAGANÇA, 1996; LORENZI, 2002), largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste, principalmente em Pernambuco e no Ceará (ALZUGARAY, 1984), sendo conhecida como Pau-ferro, Jucá, Ibirá-obi, Imirá-itá, Muirá-obi, Muirá-itá (PIO CÔRREA, 1984).

Na medicina popular, são inúmeras as propriedades terapêuticas descritas para *C. férrea*, que inclui o uso da entrecasca para o tratamento de feridas, contusões, combate à asma e à tosse crônica (BRAGA, 1976). Os frutos são antidiarréicos, anticatarrais e cicatrizantes e as raízes são antitérmicas, o extrato aquoso bruto é usado contra úlceras gástricas, além das atividades antiinflamatória e analgésica (MAIA, 2004). Da *Caesalpinia férrea* foram ainda caracterizadas as atividades cardiotônica, antimicrobiana, analgésica e antiinflamatória (CARVALHO et al., 1996), antihistamínica, antialérgica, anticoagulante e hepatotóxica (DI STASI et al., 2002).

Oliveira (2008), com o objetivo de avaliar a atividade cicatrizante do Jucá em lesões cutâneas de caprino mostrou que o extrato da casca favoreceu o processo de cicatrização.

Cavalheiro (2009), destacou as atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *C. férrea* na busca por compostos de interesse industrial e farmacológico, evidenciando que o extrato bruto das sementes não apresentou toxicidade aguda em camundongos mesmo quando administrada a dose máxima (0,3ml. 10g-1 de peso corpóreo). O extrato não causou hemólise em eritrócitos de rato e coelho, embora as sementes de *C. férrea* tenham compostos conhecidos por serem responsáveis pela atividade hemolítica, tais como fenólicos, saponinas e taninos. Foram detectadas também atividades celulásica, devido a capacidade de degradar a celulose sugerindo a presença de microorganismos endofíticos na semente, e atividades amilásica que é a capacidade de degradação do amido.

Todavia, os relatos de atividades farmacológicas, estudos fotoquímicos, potencial genotóxico e mutagênico dessa espécie são escassos. Daí a necessidade de serem feitos testes que comprovem o uso seguro e a eficácia terapêutica.

Uma vez que plantas medicinais são classificadas como produtos naturais, a maioria da população supõe que isso implica em “ausência de produtos químicos”. 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, terapêuticos 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 antígenotóxicos, 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; KUMAR & VALLIKANNAN, 2010).

Ainda são escassos os estudos que avaliam as atividades genotóxica e antigenotóxica da maioria dos extratos vegetais e de seus constituintes bioativos isolados. Entretanto, já existe uma variedade de testes em curto prazo *in vivo* e *in vitro* que detectam compostos genotóxicos e permitem identificar substâncias com risco potencial à saúde humana. Os mesmos testes podem ser utilizados para detectar agentes antigenotóxicos e contribuir para a diminuição das alterações gênicas que possivelmente resultam no aparecimento de doenças (AMES, 1993).

Dentre os diversos testes de curta duração existente, destacam-se o Teste de Micronúcleo em roedores, o Teste de Mutagenicidade de AMES em linhagens de *Salmonella typhimurium* e a Angiogênese, todos selecionados e realizados no presente estudo. O Teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores é um ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênico (que quebram cromossomos) e agentes aneugênico (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (RIBEIRO, 2003). A formação de micronúcleos na divisão celular, resultante da quebra de cromossomos devido ao não reparo ou ao reparo incorreto de lesões do DNA ou à incorreta segregação por causa do mau funcionamento do ciclo mitótico, são eventos que podem ser induzidos, principalmente, por estresse oxidativo, exposição aos genotóxicos e defeitos genéticos no ciclo celular e/ou nos genes de reparo do DNA (FENECH, 2005; BONASSI et al., 2007).

O Teste de Mutagenicidade de Ames é uma metodologia de triagem amplamente utilizada para detectar substâncias mutagênicas ou potencialmente carcinogênicas. O teste é realizado empregando mutantes das linhagens de *Salmonella typhimurium*, auxotrófica para o aminoácido histidina, que pode vir a sofrer a mutação reversa para a prototrofia em relação a síntese deste aminoácido. O teste consiste então, na avaliação do número de revertentes produzidos na cultura bacteriana pela incubação das células com o composto em estudo. Devido à composição do meio, só formarão colônias as células prototróficas para a histidina,

provenientes de mutações espontâneas ou pela reversão induzida pelos agentes indutores (MARON & AMES, 1983).

Já se conhece na literatura que produtos de origem vegetal apresentam substâncias indutoras de angiogênese (WANG *et al.*, 2004). Angiogênese é definida como sendo a formação de novos vasos sanguíneos por um processo de germinação de brotos endoteliais a partir de vasos capilares preexistentes (FOLKMAN, 2004). A angiogênese apresenta importante função nos processos fisiológicos normais e nos processos patológicos (DVORAK, 2005). Os processos fisiológicos como a menstruação, ovulação, nidação, recuperação de tecidos lesados, cicatrização de feridas são dependentes da ação angiogênica. Nos processos patológicos, a angiogênese participa de afecções como artropatias crônicas, psoríase, retinopatia diabética, crescimento tumoral e disseminação metastática (GOUGH, 2007; GONZALEZ *et al.*, 2000; HARD 1998; FOLKMAN, 1976).

Sendo assim, escolhemos o modelo experimental utilizando membrana corio-alantóidea (CAM) do ovo embrionado de galinha por apresentar vantagens como reprodutibilidade do ensaio, baixo custo, facilidade de observação da rede vascular formada (RIBATI *et al.*, 1996).

Tendo em vista que a *Caesalpinia Férrrea* (jucá) vem sendo utilizado amplamente pela população para fins terapêuticos, principal ponto motivador para a realização deste trabalho cujo objetivo foi avaliar os efeitos da solução aquosa da *Caesalpinia Férrrea (Tul) martius* (Jucá) em camundongos, bactérias e ovos embrionados de galinha observando possíveis atividades angiogênica/ antiangiogênica, genotóxica e antigenotóxica e mutagênica/ antimutagênica.

2. REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico do uso de plantas medicinais

Desde os tempos mais remotos, as plantas são usadas pelo homem como alimentos e no tratamento de doenças (BENDAZZOLI, 2002). Neste sentido, a origem do conhecimento do homem sobre as propriedades medicinais das plantas confunde-se com sua própria história (NOVAIS et al., 2003; COWAN, 1999; CALIXTO, 2000).

Desde o ano 3.000 a. C. tem – se informações de que a China dedicava-se ao cultivo de plantas medicinais. Registros revelam que o imperador Sheng Nung utilizou uma serie de plantas em seu próprio corpo para saber o efeito que provocavam. Dentre elas, ele destacou o uso da raiz de ginseng, o ruibarbo e a cânfora, às quais ele atribuiu longevidade e bem-estar (JORGE, 2008). Em sua obra denominada Pen Tsao A grande Fitoterapia, que remonta aos 2800 anos a.C., Sheng Nung reúne inúmeros conhecimentos a cerca do uso de plantas na forma medicinal (ELDIN & DUNFORD, 2001).

Acredita-se que os primeiros documentos escritos sobre plantas estejam revelados em placas de barro babilônicas de 3.000 anos a.C., que ilustravam tratamentos médicos e registravam importações de ervas para a Babilônia. Registra-se também que a farmacopeia babilônica abrangia 1400 plantas (ELDIN & DUNFORD, 2001).

No papiro de Ebers, de 1.550 a.C., descoberto em meados do século passado em Luxor, no Egito, foram mencionadas cerca de 700 drogas, incluindo extratos de plantas, metais como chumbo e cobre, e venenos de animais de procedências diversas (ELDIN & DUNFORD, 2001). O papiro de Ebers representa o primeiro tratado médico egípcio conhecido, destinado ao tratamento de doenças internas e a indicações sobre a constituição dos medicamentos empregados em cada doença (ROBERTSON, 1998).

As civilizações mais recentes como os povos helênicos deixaram importantes contribuições na área médica, cujos tratamentos, em geral, associavam-se ao uso de

plantas. Hipócrates (460-361 a.C.), denominado “Pai da Medicina”, fez em sua obra “Corpus Hippocraticum”, uma síntese dos conhecimentos de seu tempo, indicando para cada enfermidade o remédio vegetal e o tratamento adequado (JORGE, 2008). Na mesma época, Teofrasto (372-275, a.C.) em sua obra “História das Plantas”, catalogou cerca de 500 espécimes vegetais, fazendo descrições botânicas muito precisas e indicações sobre efeitos tóxicos e propriedades curativas, nessa época, já eram conhecidos os opiáceos e inúmeras plantas tóxicas (ROBERTSON, 1998).

Todas as civilizações deixaram evidências escritas do uso de plantas para o tratamento de uma grande variedade de enfermidades (ROBERTSON, 1998). No entanto, foi durante a Idade Média que a evolução da Arte de Curar teve certa interrupção. Devido ao evento histórico, como ascensão e queda do Império Romano e fortalecimento da Igreja Católica, que revelava desinteresse no conhecimento científico e considerava a doença como um “castigo de Deus”, o estudo das plantas medicinais ficou estagnado por um longo período (RIBEIRO, 2001).

A partir do século XV, o empirismo da medicina e da farmácia da Idade média começa a ceder lugar à experimentação, ao mesmo tempo em que vão sendo introduzidos na terapêutica novos fármacos, com a chegada dos portugueses à África, à Índia e ao Brasil, e dos espanhóis aos outros países da América do Sul. Durante o século XIX, o uso de plantas medicinais ficou mais restrito e cresceu o uso de medicamentos obtidos através de processos químicos industriais (LORENZI & MATOS, 2002).

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 dentro das indústrias farmacêuticas, por não haver comprovação científica da eficácia das substâncias de origem vegetal, houve 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).

Atualmente, os fitoterápicos representam uma forma alternativa para o tratamento de doenças em várias partes do mundo e também porque representam uma fonte inesgotável de recursos naturais para obtenção de novos fármacos (SCHENCKEL, *et al.*, 2000).

Apesar de muitas investigações terem sido feitas até o momento, ainda é grande o número de plantas que não foram estudadas, tanto no sentido de uma utilização direta, como da obtenção de novos constituintes ativos isolados ou que venham fornecer moléculas que sirvam para formação de um fármaco semissintético (ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006). O Brasil detém cerca de 10% de toda flora mundial, apresenta um pequeno número de espécies vegetais estudadas sob o ponto de vista químico e farmacológico. Estima-se que apenas 15 a 17% das plantas brasileiras foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (SOERJATO, 1996).

O uso tradicional e o elevado consumo de plantas medicinais não comprovam sua efetividade biológica nem ausência de toxicidade. Assim, faz-se necessário conhecer a dose eficaz e aquela que provoca toxicidade, razão pela qual são fundamentais o estudo farmacodinâmicos e toxicológicos padronizados (BRAGGIO, 2002). O estudo farmacológico pré-clínico de um produto natural tem por objetivo comprovar ou não sua eficácia, avaliar o grau de toxicidade e traçar o perfil dos efeitos colaterais, bem como relacionar esses efeitos às doses e a um possível mecanismo de ação em várias espécies de animais de experimentação (ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006).

A falta de dados sobre as propriedades farmacológicas e fitoquímicas justifica o presente estudo, que se caracteriza em utilizar ensaios biológicos para investigar os efeitos da solução aquosa da *Caesalpinia Férrera* (Tul) martius (Jucá) em camundongos, bactérias e ovos embrionados de galinha observando possíveis atividades angiogênica/ antiangiogênica e mutagênica /antimutagênica.

2.2 Cerrado

O Brasil, reconhecidamente, é o país detentor de uma das mais altas taxas em biodiversidade. Devido ao extenso território, a área de florestas tropicais abriga a maior diversidade biológica e genética terrestre. Estimativas citam a existência de 40 a 55 mil espécies vegetais nos biomas brasileiros (PAVAN-FRUEHAUF, 2000).

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) lançou o Mapa de Biomas do Brasil mostrando os seis grandes biomas do país: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa. Dentre esses biomas, o Cerrado é o segundo maior em área do País, ocupando 23% do território nacional (dois milhões de Km²), e sendo considerado um complexo vegetacional de grande heterogeneidade fitofisionômica (RIBEIRO & WALTER, 1998).

O termo “Cerrado” origina-se do espanhol e significa fechado, vedado, denso e provavelmente foi empregado na designação de formação vegetal de difícil travessia. Caracterizado como vegetação de savana na classificação internacional, esse bioma localiza-se predominantemente no Planalto Central do Brasil, ficando entre 5° e 20° de latitude Sul e 45 e 60 de longitude Oeste, com altitudes variando de quase 0 a 1800 metros, ocupando diferentes bacias hidrográficas (Amazonas, Tocantins, Paraná, Paraguai, São Francisco e Parnaíba), e exibindo grande diversidade de solos e climas que se refletem numa biota extremamente diversificada (KLINK, 2005). O Cerrado abrange os estados de Goiás, Tocantins e o Distrito Federal, parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia e São Paulo, além de ocorrer em áreas distintas ao norte dos estados do Amapá, Amazonas, Pará e Roraima, e ao sul, em pequenas ilhas no Paraná (KLINK & MACHADO, 2005)

O clima predominante do Cerrado é o tropical sazonal, de inverno seco, com temperaturas médias anuais em torno de 22-23°C, mas com oscilações sazonais onde as máximas podem chegar a 40°C e as mínimas de 0°C (fato que ocorre ocasionalmente) (RIBEIRO & WALTER, 1998).

A maioria dos solos da região dos cerrados são classificados como Latossolos, cobrindo 46% da área. Esses tipos de solos podem apresentar uma

coloração variando do vermelho para o amarelo, são profundos, bem drenados na maior parte do ano, apresentam acidez, toxidez de alumínio e são pobres em nutrientes essenciais como fósforo, cálcio, magnésio, potássio e alguns micronutrientes, para a maioria das plantas. Além desses, tem-se os solos pedregosos e rasos (neossolos litólicos), geralmente de encostas, os arenosos (neossolos quartzarênicos), os orgânicos (organossolos) e outros de menor expressão (RIBEIRO & WALTER, 1998).

A fauna é constituída, principalmente por mamíferos de pequeno porte, répteis, aves e insetos, normalmente distribuídos em pequenas populações, em função da heterogeneidade da vegetação (RATTER, 1997). De acordo com Ribeiro & Walter (1998), a flora é bastante diversificada, distinguindo-se onze tipos fisionômicos distribuídos em formações florestais, savanas e campestres, onde ainda encontram-se muitos subtipos.

Uma das características da vegetação é apresentar um mosaico que vai desde plantas lenhosas (árvores e arbustos) até herbáceas, tornando-se, assim, uma região peculiar e muito diversificada fisionomicamente (RIBEIRO & WALTER, 1998). A vegetação do Cerrado tem sido apontada como uma fonte rica em metabólitos secundários, apresentando potencial para uma vasta gama de atividades biológicas. Uma justificativa razoável para isso seria que estas plantas estão sujeitas a uma situação de estresse consideravelmente elevada, atribuída ao clima peculiarmente árido e quente dessas regiões, além dos solos, em geral, apresentarem-se ácidos e deficientes em numerosos componentes químicos, com excesso de alumínio e ferro. Somando-se a isso, há ainda escassez de matéria orgânica devido ao dessecamento de folhas e órgãos pelo calor intenso e ar seco, e pela destruição provocada por queimadas. Esses fatores em conjunto, levam a uma intensificação pela competição por nutrientes, conduzindo as plantas à produção de compostos químicos que possibilitem sua adaptação ao ecossistema (KLINK & MACHADO, 2005)

De acordo com Melo (2007), inúmeras espécies vegetais do Cerrado são popularmente utilizadas na medicina em função das suas propriedades analgésicas, antiulcerogênicas, antimicrobianas, antitumorais, antiplasmodial, antioxidante,

inseticida, entre outras. Entretanto, ainda há carência de estudos voltados para a detecção de atividades biológicas de plantas do Cerrado.

Dentre as espécies vegetais do Cerrado com propriedades terapêuticas promissoras, estão aquelas pertencentes à ordem *Fabales*, que compreende a família *Caesalpinaceae* (Leguminosae Caesalpinioideae)

2.3 *Caesalpinia férrea* Martius ex. Tul. var.

Caesalpinia Férrea Martius ex. Tul var. *Férrea* é uma árvore que pertence à família Leguminosae, uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas com cerca de 650 gêneros, que reúnem mais de dezoito espécie (CRONQUIST, 1981). A subfamília Caesalpinioidea consiste de aproximadamente 150 gêneros e 2200 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais, cresce em todo o Brasil (BRAGANÇA, 1996; LORENZI, 2002), largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste, principalmente em Pernambuco e no Ceará (ALZUGARAY, 1984), sendo conhecida como Pau-ferro, Jucá, Ibirá-obi, Imirá-itá, Muirá-obi (PIO CÔRREA, 1984).

De acordo com o Sistema de Classificação a taxonomia de *Caesalpinia Férrea* var. *parviflora* obedece à seguinte hierarquia: Divisão: *Magnoliophyta* (Angiospermae), Classe: Magnoliopsida (Dicotyledonae), Ordem: Fabales, Família: *Caesalpinaceae* (Leguminosae Caesalpinioideae), Espécie: *Caesalpinia Férrea* Martius ex Tul. var. *férrea*. Esse nome *Caesalpinia* é uma homenagem a Andrea Caesalpinio, botânico italiano; o termo *férrea* é devido à alta densidade da madeira, lembrando o ferro.

Possui flores amarelas pequenas e em cachos; frutos de cor marrom escura-avermelhada, carnosa, indeiscente, lustrosa, chata, assimétrica, que ao amadurecer torna-se negra e chocalhante, porque as sementes se soltam dentro de cada lóculo na vagem, medindo de 5 a 10 cm de comprimento por 2 a 4 cm de largura e 2 a 10 sementes. (PIO CÔRREA, 1984; LORENZI, 2002). As sementes: possuem formato oblongo, de ápice mais ou menos cuneiforme, de coloração marrom-escura (PIO CÔRREA, 1984).

Apresentam rugosidades e estrias arqueadas, duríssimas, com 5 a 10 mm de comprimento por 4 a 6 mm de largura. São indeiscentes e, por isso, a colheita pode ser feita catando-se os frutos caídos em área limpa (PIO CÔRREA, 1984). São de comportamento ortodoxo ao armazenamento, apresentam, em média, 3,46% de cinzas, 8,09% de proteínas, 7,80% de amido e 3,30% de óleo, sendo consideradas de bom potencial para armazenamento a médio ou a longo prazo, devido o baixo teor de óleo (PIO CÔRREA, 1984; LORENZI, 2002).

O tronco geralmente é curto e com bifurcações quando isolada, cor marrom, apresenta tronco reto e cilíndrico. Fuste com até 15 m de comprimento. As ramificações são dicotômica, simpódica. Copa irregular muito ramificada, com folhagem miúda, de coloração verde-clara, que se sobressai ao marrom dos ramos. A casca apresenta espessura de até 10 mm. A casca externa é lisa, cinza, com manchas brancas irregulares, que contrastam com o fundo escuro do tronco, causando belo efeito decorativo. A casca se renova anualmente, com tonalidade verde-escura. A casca internamente é amarelo-clara, escurecendo em contato com o ar. As folhas são compostas, duplo-pinadas, com 9 a 13 pinas e estas, com 18 a 32 folíolos, pequenos e glabros (PIO CÔRREA, 1984; LORENZI, 2002).

Quanto à biologia reprodutiva e fonológica seu sistema sexual é hermafrodita, o vetor de polinização são principalmente as abelhas e diversos insetos pequenos. A floração ocorre de outubro a maio, no estado de São Paulo; de dezembro a fevereiro, em Pernambuco; em janeiro, em Minas Gerais, e em abril, no Estado do Rio de Janeiro. Plantado no Paraná floresce de janeiro a março (CARVALHO, 1996). Os frutos amadurecem de fevereiro a junho, em Pernambuco; de maio a dezembro, no Estado de São Paulo; de maio a outubro, em Minas Gerais, e de agosto a setembro, no Estado do Rio de Janeiro. Plantado no Paraná e no Rio Grande do Sul, frutifica de julho a setembro. O processo reprodutivo inicia aos 3 anos de idade, em plantios em sítios adequados, a dispersão de frutos e sementes são autocórica, principalmente barocórica, por gravidade e zoocórica (CARVALHO, 1996).

A *Caesalpinia Férrica* var. *Martius* ocorre de forma no Brasil, nos seguintes estados: Alagoas, Ceará, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraíba, Piauí, Estado do Rio de Janeiro (LIMA, 2010e).

A árvore é bastante ornamental, podendo ser empregada na arborização de ruas e avenidas, e também aproveitada para plantios em áreas degradadas, além de fornecer lenha e madeira para construção civil. Além disso, o pau-ferro é considerado uma forrageira importante no Nordeste, tanto pela sua adaptação natural à região, como também por fornecer forragem durante a seca (RIZZINI, 1990).



Figura 1 – *Caesalpinia férrea* – visão panorâmica da árvore com galhos e folhas verdes. Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 14.1 mega pixels



Figura 2 – *Caesalpinia férrea* – Detalhes dos galhos e da fava. Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 14.1 mega pixels



Figura 3 – *Caesalpinia férrea* – Detalhes dos galhos e flores. Fonte: Foto extraída do site belezadacaatinga.blogspot.com/



Figura 4 – *Caesalpinia férrea* – Detalhes das flores. Fonte: Foto extraída do site belezadacaatinga.blogspot.com/ 2014.

Algumas das propriedades terapêuticas de *Caesalpinia férrea* têm sido descritas, e incluem tratamento de ferimentos e contusões, alívio de tosse crônica e asma (HASHIMOTO, 1996). Além disso, algumas pesquisas mostram que o jucá possui ação antiulcerogênica (BACCHI; SERTIE, 1994; BACCHI et al, 1995) e antiinflamatória, bem como propriedades analgésica (CARVALHO et al., 1996). Os frutos têm sido usados no tratamento de diabetes (BALBACH, 1972) e na prevenção do câncer (NAKAMURA et al., 2002a). Os constituintes extraídos dos extratos alcoólicos já foram avaliados in vivo quanto ao seu efeito antitumoral em processos carcinogênicos de pele, no segundo estágio (NAKAMURA et al., 2002b).



Figura 5 – *Caesalpinia férrea* – Detalhes do fruto maduro.
Fonte: Fotografia extraída do site: ibflorestas.org.br/ 2014.

As raízes do pau-ferro são utilizadas como antipiréticas e antidiarréicas, e a decocção da madeira é anticatarral e cicatrizante (PIO CÔRREA, 1984; LEWIS, 1987). A casca do caule é usada ainda como descongestionante, no tratamento de enterocolite e diarréia, para tratamento de diabetes e contra reumatismo mostrando ainda possíveis benefícios no sistema cardiovascular dos usuários (BALBACH, 1972). Um estudo fitoquímico preliminar do extrato hidroalcolólico da casca e das folhas demonstrou a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos (LORENZI, 2008).

Foram observados também que o extrato aquoso de *Caesalpinia férrea* mostrou-se ainda eficaz no estímulo da mielopoiese frente à listeriose e tumor ascítico de Ehlich em ratos, promovendo certa proteção contra dose letal de *Listeria monocytogenes* e aumentando a sobrevivência dos animais respectivamente (QUEIROZ et al., 2001).

A comercialização e a utilização de extratos aquosos e alcoólicos, farinhas de diversos tecidos e da vagem de *Caesalpinia férrea* desperta o interesse desta planta para estudos e aplicações na medicina popular (LORENZI, 2008).

Recentemente, tem se dado também à ênfase no estudo das substâncias provenientes de plantas que apresentam propriedades angiogênica e antiangiogênica (JONES, 2004; FOLKMAN, 2004).

2.4 Angiogênese e antiangiogênese

Angiogênese é definido como a formação de novos vasos sanguíneos por um processo de germinação de brotos endoteliais a partir de vasos capilares preexistentes (FOLKMAN, & INGBER, 1992). A angiogênese está presente em processos fisiológicos como a menstruação, ovulação, cicatrização de feridas e outros. Particularmente, no coração a angiogênese promove a ramificação vascular das coronárias, aumentando o fluxo sanguíneo e a sua força de contração, repercutindo favoravelmente durante o esforço físico. A angiogênese está presente também nos processos patológicos como artropatias crônicas, psoríase, retinopatia diabética, degeneração macular, crescimento tumoral e disseminação metastática (SAFLATE *et al.*, 2002; FOLKMAN, 1976).

A angiogênese é um mecanismo controlado por fatores ativadores e inibidores, que se desenvolve quando algum estímulo induz a mudança das células endoteliais de um estado de quiescência para um estado de replicação e migração, formando capilares (SAFLATE *et al.*, 2002). 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 (FOLKMAN, 2004).

Apesar da tumorigênese angiogênica dependente, atualmente têm-se realizados estudos no sentido de detectar substâncias que pudessem induzir a angiogênese. A potencialidade e possibilidade de aplicabilidade clínica são grandes, por exemplo, na vascularização miocárdica, do sistema nervoso central, órgãos em isquemia, substituição de vasos arteriais de grande calibre, e inclusive no tratamento de doenças neoplásicas (FOLKMAN, 2004).

Trabalhos realizados por Mrue (2000), Sader *et al.*(2000), Oliveira *et al.* (2003) e Melo-Reis *et al.* (2010) evidenciaram a presença da atividade angiogênica no látex

das espécies vegetais da família das *Euphorbiaceae*. Entretanto, o uso popular de outras substâncias extraídas dos vegetais é utilizado como medicamento em inúmeras regiões do Brasil e inclusive em Goiás (ORTENCIO, 1997). Porém, não se tem nenhuma evidência científica dos benefícios ou dos malefícios dos preparo e uso dos medicamentos populares.

Mrué (1997), trabalhando com látex da *hevea brasiliensis* (seringueira), detectou que esse apresentava substâncias ativadoras da angiogênese, promovendo a regeneração e formação de um novo esôfago em cão que foi parcialmente removido. Posteriormente, Mrué (2000), utilizou a membrana desse material e demonstrou que essa foi capaz de induzir a angiogênese em córnea de coelho. Com a mesma membrana Sader *et al.*(2000) fizeram substituição parcial do pericárdio de cães, e observaram que houve a regeneração do pericárdio nativo. Em 2003, Oliveira e colaboradores realizaram a miringoplastia utilizando-se a membrana desse látex e constataram que houve a regeneração do tímpano. Mrué *et al.*(2004) mostraram que a biomembrana de látex natural é um material promissor a ser usado em campo médico para reparo de tecidos.

2.5 Mutações, genotoxicidade e o câncer

A informação genética de todos os organismos vivos está armazenada nos ácidos nucleicos (DNA E RNA), sendo especificada pela sequência de bases nitrogenadas. Essa informação é transmitida de célula a célula durante o desenvolvimento e de geração a geração durante a reprodução, com considerável precisão pelo processo de replicação. Devido ao fato dessa transmissão não ser um fenômeno estático, ocasionalmente ela sofre mudança ou mutações para produzir variabilidade genética, que fornece a matéria prima para a evolução (SNUSTAD & SIMMONS, 2001).

Entretanto, a fixação do material genético de geração para geração depende da manutenção das taxas de mutação em níveis mínimos. Frequentemente, os organismos vivos são expostos a agentes ambientais que podem induzir modificações químicas tanto ao nível celular quanto molecular. Essas lesões podem

ser induzidas por agentes físicos, químicos ou biológicos que são prejudiciais às células, uma vez que afetam processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, podendo causar também alterações permanentes no DNA (mutações) e aberrações cromossômicas, que por sua vez levam a processos cancerosos e morte celular (WATSON et al., 2006).

Todo organismo sofre um certo número de mutações como resultado de operações celulares normais ou de interações aleatórias com o ambiente. Estas mutações são denominadas espontâneas; a frequência na qual elas ocorrem é característica para cada organismo em particular e é algumas vezes denominada nível basal. As mutações são eventos raros e, é claro aquelas que danificam um gene são selecionadas negativamente durante a evolução. É, portanto difícil à obtenção de grandes números de mutantes espontâneos para estudo a partir de populações naturais (LEWIN, 2001).

A ocorrência de mutações pode ser aumentada pelo tratamento com certos compostos. Estes compostos são chamados de mutagênicos e as alterações que eles causam são referidas como mutações induzidas. A maioria dos agentes mutagênicos age diretamente em função de sua capacidade de modificar uma determinada base do DNA ou de ser incorporado no ácido nucleico (LEWIN, 2001).

Por causarem lesões no material genético e potencialmente gerarem tumores em humanos, esses agentes são conhecidos como genotóxicos e carcinogênicos (WATSON et al., 2006).

Os agentes genotóxicos podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações nas células somáticas e/ou germinativas. Para isso, o agente necessita ser transportado e ter contato com a célula, para ser capaz de ativar metabólitos e danificar o DNA. Entretanto, as células de um organismo pluricelular reagem ao dano provocado, numa tentativa de corrigir as agressões sofridas. Esse mecanismo é conhecido por processo de reparo ao DNA. Contudo, se o dano for removido antes da divisão, a célula restabelece a integridade do DNA e as funções são preservadas. Mas, se a divisão celular ocorrer antes do processo de reparo, o DNA replicará e poderá haver proliferação celular com as alterações, neste caso, a mutação será incorporada permanente na seqüência do DNA (BROWN *et al.*, 1994).

Um composto é dito genotóxico quando, sob o aspecto genético, perturba a vida ou induz à morte tanto em nível de células como de organismo (ERDTMANN, 2003). Pode ser definido funcionalmente como tendo a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Assim, as alterações que perturbam o genoma, sejam elas mutagênicas ou não, são consideradas genotóxicas (FAIRBAIRN et al., 1995).

Os agentes mutagênicos podem ser classificados como: a) aqueles que atuam diretamente sobre a molécula de DNA; b) agentes indiretos, que precisam ser metabolizados para que seus metabólitos causem danos; c) o que promovem a produção de espécies reativas de oxigênio, e d) aqueles que causam inibição no reparo e na síntese do DNA (WATSON et al., 2006).

Um composto é dito mutagênico quando é capaz de aumentar a taxa de mutação em um organismo além da espontânea. Uma mutação pode ser definida como uma mudança estável e herdável numa sequência nucleotídica do DNA, de modo que essas modificações podem ser cromossômicas ou gênicas. As alterações cromossômicas podem estar relacionadas à estrutura cromossômica, em consequência de deleções, duplicações, inversões e translocações maiores, ou ao número de cromossomos, em decorrência de falhas na citocinese, por não disjunção mitótica, entre outros. As mutações gênicas são devidas à substituição de bases (transições e transversões); frameshifts (mudança no quadro de leitura); ou inserções, deleções e translocações. (GATEHOUSE et al., 1990).

Desta forma, agentes que causam mutações são considerados genotóxicos, apesar de nem todos os agentes genotóxicos serem mutagênicos (VOGEL, 1989).

A mutação nas células germinativas, é responsável por produzir mudanças na hereditariedade, acarretando o desenvolvimento de efeitos teratogênicos e de desordens hereditárias múltiplas. Já nas células somáticas, pode propiciar a perda de controle da proliferação celular, trazendo prejuízos ao indivíduo. Assim, o agente genotóxicos e/ou mutagênicos tem um papel importante na avaliação do potencial carcinogênico, pois os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente relacionados (RIBEIRO et al., 2003).

A carcinogênese envolve a mutação sequencial de genes controladores de crescimento, expansão clonal e progressão das células, resultando em células pré-neoplásicas e neoplásicas. Mudanças que levam ao desenvolvimento das neoplasias são supostamente geradas por alterações na seqüência do DNA e produção de proteínas funcionalmente aberrantes (MOUSTACCHI, 2000), a mutação, geralmente, é adquirida através do contato do indivíduo com mutagenos. Essa exposição é constante e envolve mutagenos endógenos e exógenos ou ambientais.

Compostos com atividades biológicas há tempos vem sendo avaliados, no entanto, muitos deles ainda não podem ser utilizados na terapêutica devido às suas propriedades tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas (SUHR, 1999). A porta de entrada dos carcinógenos químicos no indivíduo é pela via oral, pele e outras, onde alcançando a célula, promovem alterações no metabolismo que afetam um ou mais eventos, possibilitando a formação da neoplasia maligna (MOUSTACCHI, 2000; BROWN *et al.*, 1994).

Em relação à via oral, estudos epidemiológicos mostram que há relação entre neoplasias e hábitos alimentares, pois os alimentos podem conter mutágenos e/ou carcinógenos, os quais ocorrem naturalmente. Mas, outros são originados durante o processo de preparo dos alimentos, por exemplo, a formação de nitrosaminas ocorre durante o cozimento de carnes. Essas aminas estão relacionadas com o carcinoma do aparelho digestório, especialmente, estômago (KARAKAYA & KAVAS, 1999), e dessa maneira, varias pesquisas científicas tem ressaltado a importância da dieta para o risco de desenvolvimento do câncer. Muitas das substancias presentes nos alimentos são comprovadamente mutagênicas e/ou carcinogênicas (ERDTMANN, 2003).

Essa via é a principal porta de entrada de mutágenos para as substâncias originadas das plantas medicinais, através de chás, infusões e outros preparados. Porém, a maioria dessas substâncias ainda não foi estudada, no que se refere ao potencial citotóxico e mutagênico, sendo necessário conhecer as propriedades e atividades biológicas das plantas de uso medicinal, para propiciar o uso com segurança (BAGATINI *et al.*, 2007).

Existem várias maneiras de se prevenir o efeito adverso de certos produtos químicos e substâncias naturais, uma delas é a triagem de seu potencial genotóxico, por testes rápidos realizados especialmente com bactérias, drosófila, camundongos e cultura de células (CUNHA, 1995).

Considerando que algumas plantas comumente utilizadas pela população podem apresentar atividades genotóxicas, torna-se oportuna a realização de pesquisas visando conhecer a genotoxicidade dessas plantas.

2.6 Antimutagenicidade e Antigenotoxicidade

O termo antimutagênico foi utilizado pela primeira vez por Novick & Szilard (1952) para descrever compostos que reduzem a frequência de mutação espontânea ou induzida, independentemente dos mecanismos envolvidos. Sendo assim, substâncias naturais ou sintéticas que são capazes de modular a ação de diversos agentes potencialmente mutagênicos, são genericamente denominadas antimutagênicas.

Podemos perceber que a prevenção à doenças tem sido aceita como a maneira mais promissora de se controlar patologias. O consumo de frutas e vegetais auxilia na prevenção de processos degenerativos diminuindo a incidência e a taxa de mortalidade por câncer ou doenças cardiovasculares, por exemplo. A prevenção que os vegetais promovem contra essas patologias tem sido atribuída, principalmente, à ação de substâncias antigenotóxicas e/ou antimutagênicas presentes nesses alimentos (MITSCHER *et al.*, 19987).

Os mecanismos de ação dos antimutagênicos são classificados em dois processos maiores, denominados desmutagênico e bio-antimutagênico. Na desmutagênese, os agentes protetores, ou antimutagênicos, são capazes de inativar um agente mutagênico por ação direta, podendo ser química ou enzimática, após o processo de metabolismo; ou até mesmo, pelo sequestro ou adsorção de agentes mutagênicos e radicais livres, impedindo sua ligação ao DNA (WATERS *et al.*, 1996). Na bio-antimutagênico os antimutagênicos atuam como moduladores do reparo e

replicação do DNA, agindo em nível celular. Assim, eles podem inibir possíveis erros dos sistemas de reparo (MITSCHER *et al.*, 1996).

Os ensaios de mutagenicidade à curto prazo tem sido efetivamente utilizados para a detecção de agentes mutagênicos e potenciais agentes cancerígenos ambientais. Os ensaios podem ser utilizados para identificar potenciais agentes antimutagênicos e anticancerígenos (HEDDLE, 1973). Os sistemas celulares de mamíferos utilizados na avaliação citogenética da mutagenicidade e/ou antimutagenicidade, abrangem os testes *in vitro* e *in vivo*, sendo que nos testes *in vivo* é utilizada frequentemente camundongos e ratos (WATERS *et al.*, 1996). A maioria dos dados encontrados na literatura sobre antimutagenicidade *in vitro* são avaliados pelo teste de Ames em cepas de *Salmonella typhimurium* TA 100 e TA 98 (BROCKMAN; STACK & WATERS, 1992).

2.7 Teste de Mutagenicidade de AMES

Bruce Ames, a quem se deve o nome do teste, apresentou os primeiros resultados sobre a mutagenicidade de um grande número de compostos testados em *Salmonella typhimurium* deficientes na síntese do aminoácido histidina. Diversos agentes mutagênicos detectados primeiramente pelo teste de Ames são apresentados posteriormente como agentes carcinogênicos em testes que utilizam animais. Dentre os vários tipos de ensaios a curto prazo para avaliar a mutagenicidade/ genotoxicidade de compostos químicos ou de misturas complexas, o teste de Ames se destaca devido à sua simplicidade, baixo custo, sensibilidade e reprodutividade (MARON & AMES, 1983).

Esse ensaio emprega cepas de *S. typhimurium* derivadas da linhagem parental LT2, auxotróficas para histidina (his), apresentando diferentes mutações no operon desse aminoácido. As linhagens utilizadas foram especialmente construídas para detectar compostos que induzem mutações gênicas por deslocamento do quadro de leitura do DNA (frameshift). No caso das cepas TA 97 e TA 98, ou por substituição dos pares de bases nitrogenadas, no caso das cepas TA 100 e TA 102 a frequência de reversão é facilmente medida pela contagem do número de colônias

prototróficas para a histidina, provenientes de mutações espontâneas, ou de mutações induzidas por agentes mutagênicos (VALENT, 1990). O tratamento com agentes antimutagênicos poderá atenuar o aparecimento de lesões no DNA, ou seja, haverá diminuição na formação de colônias revertentes (NEVES, 2007).

Nos ensaios de mutagenicidade e antimutagenicidade, são sempre incluídos os controles positivos e negativos. No controle negativo deve ser utilizado o diluente da amostra a ser testada. Já no controle positivo são usados compostos sabidamente mutagênicos que são específicos para cada linhagem de *S. typhimurium*. A azida sódica, por exemplo, é utilizada como controle positivo da cepa TA 100 sem a adição de mistura S9, e a 4-nitroquinolina (4NQQ) é utilizada em TA 98 para induzir mutação nessas colônias também na ausência de fração S9 (KAEZER, 2008).

Segundo Maron & Ames (1983), a sensibilidade e versatilidade das cepas de *S. typhimurium* na detecção de agentes mutagênicos se devem a algumas alterações genéticas adicionais conferidas ao genoma bacteriano. Além disso, cada cepa apresenta uma taxa de reversão espontânea específica. Todas as cepas apresentam uma mutação denominada *rfa* que causa perda parcial de barreira de lipopolissacarídeos da parede bacteriana, facilitando a difusão de moléculas grandes para a célula, como as aminas aromáticas, hidrocarbonetos e aflatoxinas (TEJS, 2008).

A mutação existente na cepa TA 100, denominada *his G46*, selecionada para o presente estudo resulta da substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC), e pode ser revertida para o estado selvagem por um composto mutagênico que cause uma substituição de pares de bases num dos pares GC (MARON & AMES, 1983).

2.8 Teste do Micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*

O teste do micronúcleo em medula óssea de roedores é um ensaio *in vivo* e amplamente utilizado para detecção de agentes genotóxicos. Os micronúcleos (MN) aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células

parentais. Os dois fenômenos básicos que acarretam na formação do MN em células mitóticas são a quebra cromossômica e a não disjunção no aparato mitótico (RIBEIRO, 2003).

Os micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos cromatídicos semelhantes em estrutura ao núcleo, formados por parte de cromossomos acêntricos ou cromatídicos e cromossomos inteiros ou cromátides que se atrasaram na anáfase e não foram incluídos no núcleo da célula-filha na telófase durante o processo de divisão celular. Tem sido demonstrado que, quando a membrana nuclear é refeita, o DNA serve de catalisador para se formar um completo envelope nuclear em torno dele (ALBERTS *et al.*, 2002).

Por esta característica, qualquer fragmento ou cromossomo inteiro separados do núcleo principal, formam um pequeno núcleo localizado no citoplasma celular, que é denominado de micronúcleo. O teste do MN foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea hematopoiética (MOH) de camundongos, mas é também realizado em ratos (RIBEIRO *et al.*, 2003).

Os eritroblastos normalmente localizados na MOH são os precursores dos eritrócitos do sangue periférico de mamíferos (Figura 6) e apresentam uma alta e constante produção para a reposição das hemácias maduras retiradas da circulação (hemólise fisiológica).

Os eritrócitos são células anucleadas, responsável pelo transporte da hemoglobina e quando deixa a MOH ainda apresenta RNA ribossomal, que é responsável pela síntese das hemoglobinas.

As hemácias são coradas pelos corantes habitualmente utilizados em hematologia laboratorial como o corante de Giemsa ou de Leishaman (LORENZI, 2005). Os eritrócitos, que após a coloração, apresentam-se mais basofilicamente (RNA-positivos) que as hemácias mais velhas (ENC), são denominados de eritrócitos policromáticos (EPC). Este tipo celular recém saída da medula óssea pode permanecer estável por mais ou menos 24 horas após a extrusão nuclear.

Os eritrócitos maduros são denominados de normocromáticos (ENC), por apresentarem quase apenas hemoglobina. A diferenciação entre EPC e ENC é de

fundamental importância para confirmar o aumento na incidência de MN é devido à exposição a um determinado agente (NORPPA *et al.*, 2003).

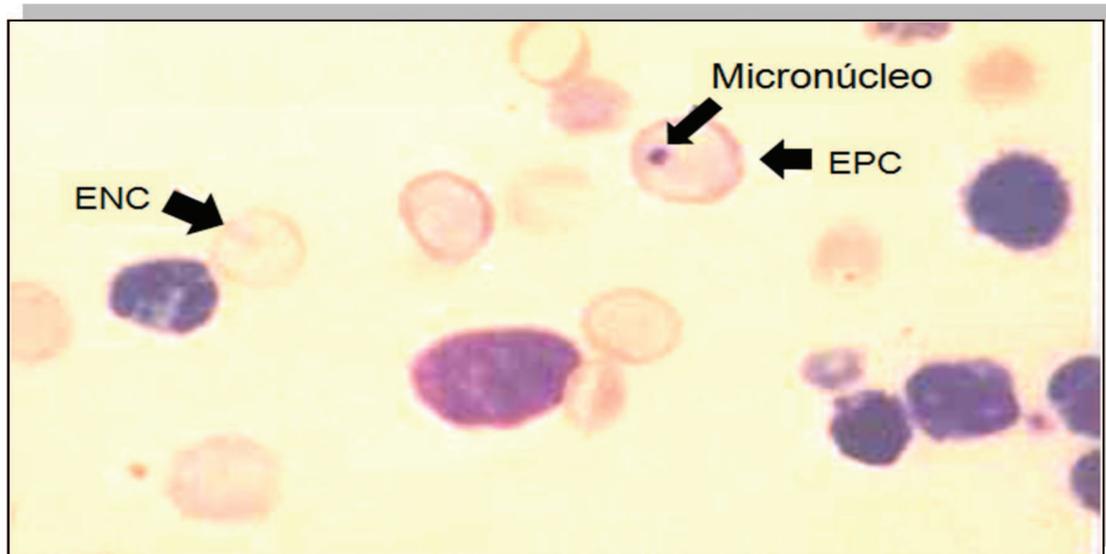


Figura 6 – Observação de eritrócitos com MNs (indicados pelas setas) em esfregaço de sangue da medula óssea de camundongo. ENC – Eritrócito normocromático. EPC – Eritrócito policromático. Fotomicrografia obtida pela câmera JVC TK1270 acoplado ao microscópio para captura das imagens usando placa Pinnacle Studio AV/DV Deluxe.

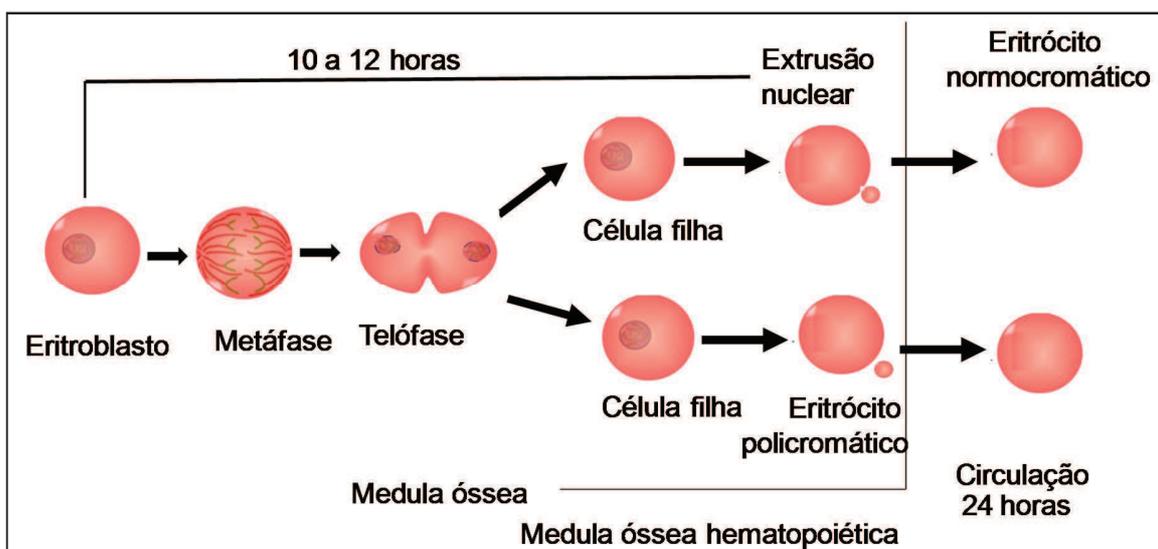


Figura 7 – Processo de maturação normal das células da linhagem eritrocitária. Fonte: Esquema desenvolvimento segundo Lorenzi (2005), em PowerPoint® 2007, da Microsoft®.

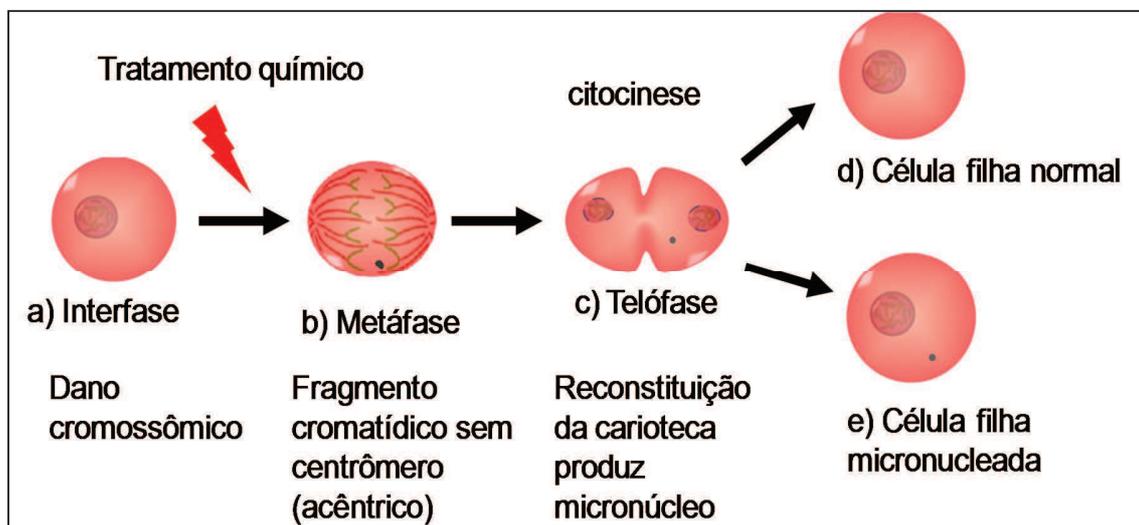


Figura 8 – Formação da célula micronucleada contendo um fragmento cromatídico acêntrico. A indução ao dano estrutura cromossômico na interfase, (a) resultando na formação de um fragmento cromatídico sem centrômero (acêntrico), pode ser visualizado quando os cromossomos são condensados na metáfase (b) da mitose. A reconstituição da membrana nuclear ao redor do fragmento cromatídico produz um micronúcleo (c), o qual pode ser quantificado na célula filha formada após a divisão (e). Fonte: Esquema desenvolvido segundo Ribeiro *et al.* (2003), em PowerPoint® 2007, da Microsoft®.

O teste do micronúcleo em MOH de camundongos tem por objetivo detectar e quantificar a ação de substâncias indutoras de metagênese e/ou antimutagênese. O teste do MN tem sido largamente utilizado na avaliação do potencial genotóxico de agentes físicos e químicos (DING *et al.*, 2003, CHUNG *et al.*, 2002) no biomonitoramento de populações humanas ocupacionalmente expostas a agentes mutagênicos (BOLOGNESI *et al.*, 2004) na pesquisa de compostos inibidores de carcinogênese (ROY *et al.*, 2003) e em estudos ecotoxicológicos (LORENT *et al.*, 2002). É um método eficaz e possível de ser realizado a baixo custo (ROSEFORT *et al.*, 2004).

O ensaio do MN pode ser executado em qualquer população de células que estejam em constante divisão. Nesse caso, a medula óssea hematopoiética de

mamíferos é indicada para o estudo, uma vez que as células levam de 10 a 24 horas para completar um ciclo de divisão (Figura 8) (RIBEIRO, *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS

Os objetivos desta pesquisa podem ser assim apresentados:

✓ Geral:

- Avaliar as atividades angiogênica/antiangiogênica, genotóxica/antigenotóxica e mutagênica/antimutagênica da solução aquosa da *Caesalpinia Férra (Tul) martius* (Jucá).

✓ Específicos:

- Detectar a possível atividade angiogênica e/ou antiangiogênica da solução aquosa da *Caesalpinia Férra (Tul) martius* (Jucá) mediante realização de testes laboratoriais “*in vivo*”, utilizando como modelo experimental a membrana corioalantóidea do ovo embrionado de galinha.
- Detectar a possível presença de atividades mutagênicas e/ou antimutagênicas da solução aquosa da *Caesalpinia Férra (Tul) martius* (Jucá) mediante a realização do teste de mutagenicidade Ames, utilizando a cepa TA 100.
- Detectar a possível presença da atividade genotóxica e/ou antigenotóxica da solução aquosa da *Caesalpinia Férra (Tul) martius* (Jucá) mediante realização de experimentos “*in vivo*”, pelo tratamento simultâneo do extrato da planta e de um composto sabidamente genotóxico Mitomicina C (MMC), utilizando-se o teste de micronúcleo em medula óssea hematopoiética de camundongos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Avaliação da atividade angiogênica na MCA

4.1.2 Ovos embrionados de galinha

Foram analisado 40 membranas corio alantóideas de ovos embrionados de galinha (*Galilus domesticus*) linhagem Rhoss, adquiridos na cidade de Trindade - Goiás.

4.1.3 Drogas e reagentes

- Controle negativo - H₂O estéril (HalexIstar Indústria Farmecêutica, Goiás, Brasil).
- Controle inibidor - Solução de dexametasona 4mg/mL – (C₂₂H₂₉FO₅) - Aché Laboratórios Farmacêuticos, Lote nº 2.668
- Controle positivo – Biomembrana de látex – Biocure – Pele Nova Biotecnologia – Lote n. 04080100
- Formaldeído 37% - Rioquímica Ltda – Lote n. 0402296

4.1.4 Procedimento experimental

A atividade angiogênica da solução aquosa do Jucá foi analisada na membrana cório-alantóide (CAM) do ovo embrionado de galinha nos meses de setembro de 2013 a janeiro de 2014 no Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos, do Mestrado de Ciências Ambientais e Saúde, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Primeiramente, ovos embrionados de galinha foram incubados em estufa automática durante os cinco dias a 37°C (±1° C) e com umidade entre 60 e 70% para a formação da MCA (RIBATTI *et al.*, 1996).

No quinto dia de incubação foi realizada na casca do ovo em sua base maior, uma abertura circular de 1,0 cm de diâmetro, com auxílio de uma micro-retífica Dremel (figura 9A). Posteriormente, foi retirada a membrana da casca com o objetivo de expor a

MCA e os ovos novamente incubados nas mesmas condições, segundo técnica de ensaio recomendada (RIBATTI *et al.*, 1996).

Ao final do 13° dia de incubação, cerca de 10 discos de papel de filtro estéreis, com diâmetro 5 mm cada, foram embebidos com 1ml de chá de *Caesalpinia férrea*, juntamente com os ovos controles (figura 9B).

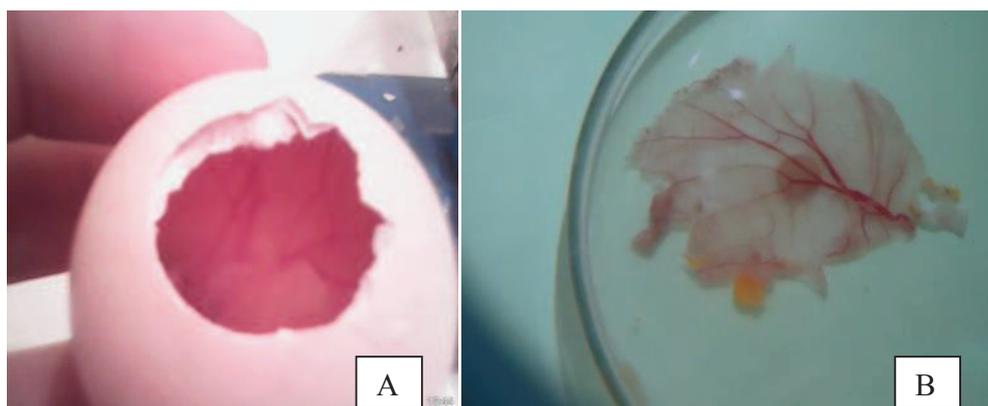


Figura 9A - Detalhes da abertura de 1,0 cm de diâmetro na casca do ovo, apresentação da CAM vascularizada obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 14.1 mega pixels em 20/10/2013). A figura 9B - Visão da rede vascular da CAM no 13° dia desenvolvimento, bem como, o papel filtro que foi embebido com a substância teste ou controles). Papel filtro colocado próximo a um vaso sanguíneo calibroso da CAM. Fotografia obtida com câmera digital Sony Cyber-Shot – 14.1 em 17/12/2013.

Os materiais (teste e controles) foram colocados diretamente sobre a membrana corio-alantóide, permanecendo até o 16° dia. No 16° dia, as MCAs foram fixadas em solução de formol (3,7 % v/v) por 10 minutos, cortadas e mantidas em placa de Petri com solução de formol.

4.1.5 Obtenção da imagem e mensuração automatizada da rede vascular

As membranas cório–alantóide foram fotografadas sobre um fundo azul claro, em tamanho 640X480 pixels e formato de RGB 24 bites, padronizados com objetivo de analisar e quantificar a rede vascular formada. A imagem capturada foi analisada e a da rede vascular neoformada foi quantificação.

A quantificação da rede vascular foi realizada por meio da determinação da área percentual de cada ensaio. Foram utilizados os programas *Gimp for Windows* (version 2.0.5) e *Imagem J* (versão 1.28).

As imagens foram preparadas de forma que a saturação, brilho e contraste permitiram uma melhor resolução dos vasos sanguíneos que foram quantificados em pixels correspondentes.

A quantidade dos pixels selecionada é proporcional ao nível de vascularização do campo de imagem capturada segundo metodologias descritas por Mendonça 2004; Doukas 2006a; Doukas 2006b é composto por pontos que geram a impressão óptica de preenchimentos sólidos, cada um desses pontos é chamado de pixel (picture element).

4.1.6 Análise dos dados

Para analisar a atividade angiogênica da solução aquosa do Jucá, as porcentagens das áreas obtidas da MCA dos grupos tratados e controles foram comparados por Krushal-Wallis (análise de variância) e, posteriormente por comparação múltipla (Método de Dunn). O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.2 Teste do micronúcleo em MOH do camundongo

4.2.1 Solução aquosa da *Caesalpinia Férrea* (Tul) *martius* (Jucá)

A planta foi coletada na cidade de Várzea Grande no estado de Mato Grosso (Latitude: -15,647551 e longitude: -56,1046863). A exsicata do material contendo caule, folhas, flores e frutos foi depositada e registrada n° 41.204 no Herbário da Universidade Federal do Estado de Mato Grosso – UFMT.

A solução aquosa foi preparada considerando a tradição. Ao ouvirmos essa palavra sempre nos vem à mente a noção de ação social, motivando repetição de comportamentos. O mesmo acontece com o uso desta planta. A população utiliza para fins terapêuticos três vagens maceradas para um (1) litro de água filtrada. Sendo assim decidimos fazer a metade da receita, utilizamos para o preparo da solução aquosa 500 ml de água fervida e 10 g do fruto, equivalente a ½ vagem.

4.2.2 Animais

Para realizar o teste do micronúcleo, foram utilizados 20 camundongos machos, saudáveis, da espécie *Mus musculus* "out bread" linhagem Swiss Webster, oriundo do Biotério da Pontífica Universidade Católica de Goiás, apresentando peso corpóreo entre 30 e 40 gramas e faixa etária entre 45 e 60 dias no dia do experimento.

Foram necessários 20 camundongos *Mus musculus* para os ensaios pretendidos: 10 para os testes de genotoxicidade e de Antigenotoxicidade, 5 para o controle negativo e 5 para o controle positivo.

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno de dimensões 40 x 30 x 16 cm, forradas com maravalha. Cada gaiola comportou no máximo 05 camundongos e alimentados com ração comercial e água filtrada. Os alimentos foram oferecidos *ad libitum*. A maravalha foi trocada a cada três dias. Os animais foram acomodados na sala de experimentação, 10 dias antes da realização dos testes. Os animais foram mantidos a temperatura ambiente, em local bem arejado com corrente de ar contínua, umidade 50 ± 20 % e ciclo de luz 12 h claro/12 h escuro.

Para o controle positivo utilizamos a mitomicina C (MMC). Trata-se de um antibiótico isolado de *Streptomyces Caespitosus* que apresenta em sua estrutura um grupo azauridina e outro quinona, bem como um anel mitosano. Esta droga tem atividade clínica restringida e foi substituída por fármacos menos tóxicos e mais efetivos em cânceres (CHU; SARTORELLI, 2005). A MMC é empregada, principalmente no tratamento do câncer de células escamosas do anus, na quimioterapia de associação em casos de carcinoma de células escamosas do colo uterino e adenocarcinomas do estômago, pâncreas e pulmão, e é especialmente utilizada no tratamento intravesical do câncer de bexiga superficial (CHU; SARTORELLI, 2005). Esta droga pode se ligar de modo covalente ao DNA e apresentar ligação cruzada. Acredita-se que ela inibe a síntese do material genético por meio de sua capacidade de alquilá-lo e produzir ligação cruzada entre os filamentos duplos (SIKIC, 2005). No interior das células a droga é convertida em forma que atua como agente alquilante, matando células nas fases G₁.M. Os

principais alvos da toxicidade da mitomicina são a medula óssea e o trato gastrointestinal.

Os detalhes referentes aos reagentes, corantes, soluções e controle negativo poderão ser verificados no apêndice.

4.2.3 Aprovação em Comitê de Ética

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, protocolo nº 0002/ 1 (Anexo).

4.2.4 Procedimento experimental - Teste do Micronúcleo em medula óssea de camundongos

Os camundongos foram divididos em quatro grupos de cinco animais cada. Foram tratados, intraperitonealmente (ip), com dose de $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ (solução aquosa do Jucá) por peso corpóreo do animal por 24 horas. O grupo controle negativo foi tratado com água destilada estéril, enquanto que o grupo controle positivo recebeu dose única intraperitoneal de mg.kg^{-1} correspondendo a 80% da DL_{50} de mitomicina C. Para a avaliação da antimutagenicidade, foi administrada a dose de $5,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ da solução aquosa do Jucá concomitantemente com uma dose de 4 mg.kg^{-1} de MMC.

Passadas 24 h, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os fêmures retirados. As epífises do fêmur foram cortadas e a medula óssea lavada com 1mL de soro fetal bovino. Após homogeneização em tubos de ensaio contendo a medula óssea e soro, o tubo foi centrifugado a $300 \times g$ por cinco minutos. O sobrenadante foi parcialmente descartado. O precipitado de células foi transferido para a lâmina de vidro onde foi feito o esfregaço celular.

Após secagem do esfregaço sanguíneo, todas as lâminas com os esfregaços foram fixadas em metanol absoluto durante 5 minutos e coradas em solução Corante de Giemsa tamponado, pH 6,8, por um período de 15 minutos (HEDDLE, 1973). Após esse período, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar em

temperatura ambiente. A confecção dos esfregaços e contagens foram realizadas pelo procedimento "duplo-cego".

4.2.5 Análise e citogenética

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico comum Nikon com a finalidade de detectar possíveis alterações e/ou perdas cromossômicas (micronúcleos) nos eritrócitos policromáticos (EPC) e da medula óssea dos animais submetidos aos diferentes tratamentos. As células foram visualizadas em objetiva de imersão (1000x), usando duas lâminas para cada animal, avaliando-se 1000 EPC por lâmina. Foi utilizada a média de duas lâminas como resultados. Para a avaliação da citotoxicidade, foram contados até 1.000 eritrócitos normocromáticos (ENC) e computados simultaneamente o número de eritrócitos policromáticos (EPC) e determinada a razão EPC/ENC.

4.2.6 Análise estatística

Observamos as frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) em 1.000 EPC de cada grupo comparando-os em relação ao grupo controle negativo ou positivo pelo teste de ANOVA e todos os pares foram comparados pelo teste Tukey, sendo considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

As frequências de EPC e ENC de cada grupo tratado com o chá da *Caesalpinia férrea* foram comparadas com o grupo controle negativo ou positivo pelo teste qui-quadrado, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

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

4.3.1 Cepas bacterianas

Foram utilizadas cepas bacterianas mutantes de *Salmonella typhimurium* TA 100, deficientes na síntese do aminoácido histidina. Na ausência desse aminoácido essas bactérias são incapazes de sobreviver.

4.3.2 Meios de cultura e soluções

Foram utilizados Top-ágar; Solução de Cloreto de Sódio a 0,5%; Solução de Histidina/ Biotina (0,5 mM); Caldo Nutriente; Meio Mínimo Glicosado (MMG) contendo solução de sais de Vogel-Bonner 50X (sulfato de magnésio heptahidratado, ácido cítrico monohidratado, fosfato de potássio dibásico, fosfato de sódio e amônio) e solução de dextrose (40%). Antes de serem utilizadas, todas as soluções preparadas foram colocadas em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Os detalhes do meio de cultura e soluções utilizadas podem ser observadas no apêndice.

4.3.3 Controles

De acordo com Maron e Ames (1983), para controles positivos, os compostos são específicos para cada cepa, no caso da TA 100 utilizados a Azida sódica (1,5ug). Como controle negativo utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) e água na proporção de 1:3, sendo a mesma utilizada para diluir as amostras teste.

4.3.4 Procedimento Experimental

As cepas de *Salmonella typhimurium* TA 100 foram incubadas em caldo nutriente a 37°C, com agitação e aeração constantes, até atingir a fase estacionária de crescimento. Para avaliação da atividade mutagênica, alíquotas de culturas da

cepa bacteriana foram incubadas em diferentes doses da solução aquosa de *Caesalpinia férrea* (1, 2, 3, 5 mg/ placas), durante 25 minutos, em tubos em triplicata com agitação e aeração constantes. Na avaliação da atividade antimutagênica, os controles positivos foram co-administrados com as diferentes doses da solução aquosa de *Caesalpinia férrea* (1, 2, 3, 5 mg/ placas).

Após a incubação, foi adicionado Agar glicosado liquefeito (top-ágar) à temperatura de 45°C, contendo solução de histidina/biotina (0,5 mM). O conteúdo foi vertido em placas, em triplicata, contendo meio MEVB sólido (meio mínimo glicosado), que foram incubadas a 37° C durante 48 horas em estufa BOD. Decorrido este período, foram contados os números de colônias revertentes prototróficas para histidina, considerando-se a média aritmética dos resultados entre as placas (MARON & AMES, 1983). Os resultados foram expressos pela média do número de revertentes prototróficas obtidas de experimentos independentes realizados em triplicata.

4.3.5 Análise dos resultados

Para avaliarmos a mutagenicidade, após a contagem do número de revertentes foi calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose utilizada. Para calcularmos a razão de mutagenicidade, utilizamos a expressão:

$$RM = \frac{\text{média do nº de revertentes por placa teste (espontâneos + induzidos)}}{\text{média do nº de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos)}}$$

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 também foram avaliados pelo teste estatístico ANOVA e o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Além disso, a porcentagem de inibição da mutagenicidade (PI) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$PI = \left[1 - \left(\frac{\text{número de revertentes por placa teste (tratamento das doses + C+)}{\text{número de revertentes por placa do controle positivo}} \right) \right] \times 100\%$$

5. RESULTADOS

5.1 Atividade angiogênica e antiangiogênica

Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa da *Caesalpinia Férrica* (Tul.) Martius (Jucá) na membrana corioalantóidea do ovo embrionado de galinha (CAM).

Foram analisadas a atividade angiogênica da solução aquosa da *Caesalpinia Férrica* na concentração de 20 mg/ml controle negativo (água destilada), controle inibidor (solução de dexametasona) e controle positivo (Biomembrana de látex - Biocure – Pele Nova Biotecnologia).

Na Tabela 1 observa-se resultados obtidos da porcentagem de vascularização na CAM que para a solução aquosa da *Caesalpinia ferrea* na concentração de 20 mg/ml, apresentou média da porcentagem de vascularização de 35,6. Enquanto que a do controle positivo foi de 42,9 e o controle negativo de 20,9%. A solução aquosa de *Caesalpinia ferrea* exibiu um aumento significativo da porcentagem da rede vascular em comparação com o controle negativo ($P < 0,05$) e também para o inibidor ($P < 0,05$). Não foi verificada diferença entre a solução aquosa e o controle positivo ($P > 0,05$), portanto, a eficiência de vascularização foi equivalente. O controle inibidor (dexametasona) mostrou uma redução considerável em relação ao controle negativo (H₂O).

Tabela 1 - Porcentagem da vascularização da membrana corioalantóidea do ovo embrionado de galinha após tratamento com solução aquosa da *Caesalpinia ferrea* e os diferentes controles

N	Controle positivo (Biocure)	Controle negativo - H ₂ O destilada estéril	Controle inibidor - Dexametasona	Solução aquosa da <i>Caesalpinia ferrea</i>
1	46,7	28,4	9,1	37,7
2	40,2	24,6	11,3	38,5
3	38,7	21,7	9,8	42,1
4	49,3	21,9	10,7	35,8
5	40,5	18,1	13,4	30,4
6	52,1	19,2	9,5	42,3
7	41,6	18,5	9,9	32,5
8	44,2	15,6	7,8	34,6
9	39,8	19,8	12,5	31,5

10	35,9	21,1	8,2	30,6
Média	42,9	20,9	10,2	35,6
Desvio Padrão	4,7	3,8	1,7	4,4

5.2 Análises histológicas

As imagens da análise histológica são apresentadas na Figura 11. A figura exibe a formação da rede vascular em diferentes grupos controles (inibidor e positivo) e no grupo do tratamento com a infusão do Jucá na concentração de 10 mg/ml.

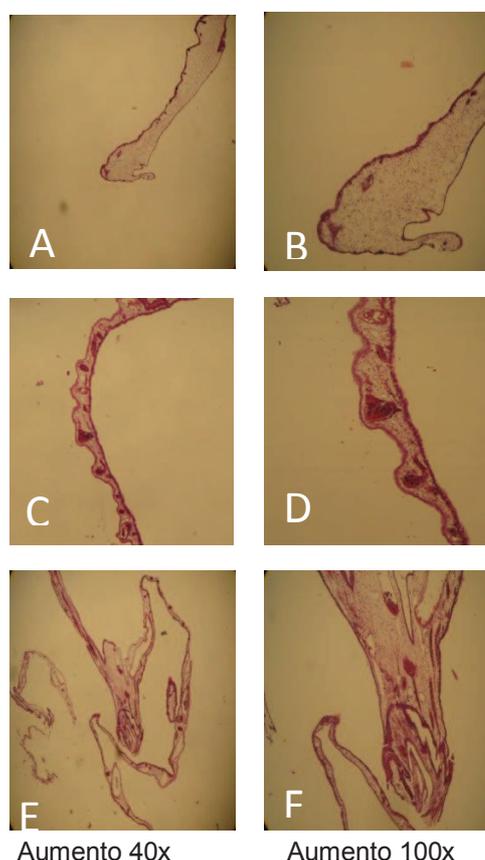


Figura 10- As secções de parafina corados com hematoxilina-eosina. Controle inibidor (dexametasona) mostra algumas células do tecido conjuntivo e também poucos vasos sanguíneos (A e B). Controle positivo (*Hevea brasiliensis* biomembrana de látex) mostra alguns vasos sanguíneos recém-formados e elementos inflamatórios (C e D) e, em detalhe, os vasos sanguíneos bem formados e muitos eritrócitos nucleados (D). O tratamento com a solução do jucá mostra vasos bem organizado, repleto de eritroblastos e elementos inflamatórios (E e F): ms ec = ectoderma = mesoderme en = endoderme.



Figura 11 – Nota-se a presença de tecido conjuntivo, elementos inflamatórios e vasos sanguíneos bem formados que exibem na luz vascular eritroblastos.

5. 3 Teste do Micronúcleo em MOH de camundongos

Avaliação da atividade genotóxica e antígenotóxica da solução aquosa da *Caesalpinia Férrea* pelo teste do Micronúcleo

Para a avaliação das atividades genotóxica e antígenotóxica da solução aquosa da *Caesalpinia Férrea*, foram realizadas pelo teste de micronúcleo na medula óssea hematopoiética de camundongos. Os resultados da frequência de MNEPC, média, desvio padrão e relação EPC/ ENC para a atividade genotóxica e antígenotóxica estão representados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Na tabela 2 observa-se que não houve atividade genotóxica e nem citotóxica da solução aquosa da *Caesalpinia férrea*. A dose da solução da *Caesalpinia Férrea* (200,0 mg.kg⁻¹ peso corporal) analisada não apresentou diferença ($p > 0,05$) na

frequência de EPCMN em relação ao grupo controle negativo. Já em relação ao grupo controle positivo as diferenças foram significativas ($p < 0,05$).

Tabela 2. Frequência de MNEPC e relação entre EPC/ENC após 24 horas do tratamento com a solução de *Caesalpinia férrea*.

	Nº de animais	Eritrócitos policromáticos Micronucleados (MNEPC)			EPC/ENC
		Dados individuais MN /1000EPC	%	Média \pm DP MN/1000EPC	
Dose da <i>Caesalpinia Férrea</i> 200,0 mg.kg ⁻¹ por peso corpóreo	5	2-1-0-0-3	0,26	1,20 \pm 1,20 ^a	0,93 ^a
H ₂ O (Controle negativo) *	5	2-1-0-4-2	0,18	1,80 \pm 1,48 ^a	0,92 ^a
MMC (Controle positivo) **	5	12-19-13-20-16	1,6	16,0 \pm 3,54 ^b	0,46 ^b

^a P > 0.05 ; ^b P < 0.05 - *Controle negativo: água destilada; ** Controle Positivo: MMC (4mg.kg⁻¹ peso corporal).

Já na tabela 3 observa-se que não houve atividade antigenotóxica da solução aquosa da *Caesalpinia férrea* administrada concomitantemente com dose de mitomicina C. Comparando a frequência de EPCMN da dose do tratamento simultâneo com o controle positivo, não houve diferença ($p > 0,05$). Já em relação ao grupo controle negativo as diferenças foram significativas ($p < 0,05$).

Tabela 3 – Frequência de MNEPC e relação entre EPC/ENC após tratamento simultâneo com MMC e solução de *Caesalpinia ferrea*

	Nº de animais	Eritrócitos policromáticos micronucleados (MNEPC)			Relação EPC/ENC
		Dados Individuais MN /1000EPC	%	Média \pm DP MN/1000EPC	
Dose - concentração de 200,0 mg.kg ⁻¹ por peso corpóreo + MMC 4mg/kg	5	12-18-14-15-19	1,56	15,6 \pm 2,88 ^b	0,53 ^d
H ₂ O (controle negativo) *	5	2-1-0-4-2	0,18	1,8 \pm 1,48 ^a	0,92 ^c
MMC (controle positivo) **	5	12-19-13-20-16	1,6	16,0 \pm 3,54 ^b	0,46 ^d

*Controle negativo: água destilada; ** Controle Positivo: MMC (4mg.kg⁻¹ peso corporal).

A relação EPC/ENC para a da solução da *Caesalpinia férrea* de 200,0 mg.kg⁻¹ mais 4 mg.kg⁻¹ de mitomicina C não houve diferença estatística quando comparada ao controle positivo.

5.4 Teste de Mutagenicidade de Ames em cepa de *Salmonella typhimurium*

Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade da solução aquosa de *Caesalpinia férrea*

Tabela 5 - Médias e desvio padrão (DP) de revertentes histidina (obtidas de três experimentos independentes realizados em triplicata), razão de mutagenicidade (RM) e porcentagem de inibição da mutagenicidade (PI) para culturas de *Salmonella typhimurium* cepa TA 100, tratadas com diferentes doses do Jucá.

Tratamentos	Mutagenicidade		Antimutagenicidade		1 Águ a des tilad a; 2 3µg
	Médias ± DP	RM	Médias ± DP	PI (%)	
Controle Negativo ¹	132 ± 14 ^B	1,00	132 ± 14 ^C	---	
Controle Positivo ²	2169 ± 136 ^A	16,43	2.169 ± 136 ^D	---	
Jucá 1 mg/placa	134 ± 22 ^B	1,01	1072 ± 106 ^C	50,6%	
Jucá 2 mg/placa	133 ± 28 ^B	1,00	1326 ± 204 ^C	38,8%	
Jucá 3 mg/placa	124 ± 9 ^B	0,94	1802 ± 100 ^D	16,9%	
Jucá 5 mg/placa	156 ± 20 ^B	1,18	1951 ± 138 ^D	10,1%	

/placa de Azida Sódica. **Mutagenicidade:** ^A (P < 0.05) e ^B (P > 0.05). **Antimutagenicidade:** ^C (P < 0,05) e ^D (P > 0,05).

Os resultados mostraram que a *Caesalpinia Férrea* (Jucá) não foi mutagênico para *Salmonella Typhimurium* cepa TA 100, nas doses testadas. Observou-se efeito protetor contra a ação da Azida Sódica na cepa TA 100 em todas as doses utilizadas, porém apenas nas menores doses testadas (1 e 2 mg/ placa) houve diferença significativa do número de revertentes histidina das placas teste quando comparadas ao controle positivo.

6 DISCUSSÃO

6.1 Atividade Angiogênica

Para a avaliação das atividades angiogênica e/ou antiangiogênica da solução aquosa do Jucá utilizou-se como modelo experimental a membrana corio-alantoidea (MCA) do ovo embrionado de galinha.

O ensaio da MCA é indicado como modelo “*in vivo*” para estudar a atividade angiogênica e antiangiogênica de várias substâncias como fatores de crescimento, citocinas, hormônios, tecido de enxerto e outros (ZWADLO-KLARWASSER *et al.*, 2001). A toxicidade de drogas também pode ser avaliada na MCA em termos de morte do embrião ou efeitos adversos no MCA, inclusive inflamação e neovascularização (VARGAS *et al.*, 2007).

A solução aquosa do Jucá na concentração de 20 mg/ml exibiu um aumento significativo da porcentagem da rede de vascular na MCA do ovo embrionado de galinha quando comparados aos grupos controles negativos e inibidor ($p < 0.05$). A formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese) é um importante fator para o processo cicatricial (BALBINO *et al.*, 2005).

Diante disso, nossos resultados firmam os achados de outros pesquisadores que avaliaram o efeito cicatrizante da *Caesalpinia ferrea*. Oliveira e colaboradores (2010) verificaram que a pomada da casca do jucá em pó apresenta eficiência significativa na reparação cicatricial de feridas cutâneas em caprinos. CRISCI *et al.* (2013) constatou que a pomada de *C. Férrea* a 10% possui melhor atividade cicatrizante em lesões de camundongos em relação a pomada de *Aloe vera*.

Esta atividade angiogênica provavelmente se deu por conta da ativação de resposta inflamatória. Esta resposta é fundamental para que ocorra angiogênese nos seres vivos, principalmente mamíferos (MELO-REIS *et al.*, 2010; HIJANO, 2013). Para tanto, esta ativação pode ser explicada pela presença de compostos ativos do jucá, como os taninos (GONZALEZ *et al.*; 2004).

Responsáveis pelo efeito adstringente, os taninos conferem ação cicatrizante através da precipitação de proteínas de regiões lesadas o que forma um

revestimento protetor o qual auxilia na reparação tecidual pela redução da permeabilidade e exsudação da ferida (BEDI & SHENEFELT, 2002).

Diante dos resultados obtidos neste estudo, foi possível concluir que a solução aquosa do fruto do jucá na concentração de 20 g/mL promoveu o processo angiogênico na membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha.

6.2 ATIVIDADES GENOTÓXICA E ANTIGENOTÓXICA

A avaliação das atividades mutagênica e/ou antimutagênica da solução aquosa do Jucá foram realizados os testes de micronúcleo na medula óssea hematopoiética de camundongos e teste de mutagenicidade de Ames em *Salmonella typhimurium* cepa TA100.

Os resultados do teste do micronúcleo indicaram a ausência de atividades mutagênica e citotóxica da solução do Jucá na dose de 200,0 mg.kg⁻¹ por peso corpóreo, uma vez que não houve aumento na frequência de micronúcleo em eritrócitos policromáticos, quanto comparados ao grupo controle negativo. Este resultado está em concordância com os achados de Cavalheiro e colaboradores (2009), onde o extrato aquoso de semente do Jucá não apresentou toxicidade aguda em camundongos mesmo quando administrado sua dose máxima (0,3mL.10g⁻¹ de peso corpóreo). Souza et al. (2006) também detectou resultados semelhantes e verificou que a mistura de compostos encontrados no extrato não induziu um aumento significativo no número de células com micronúcleos ou aberrações cromossômicas, quando administradas em doses de 500 , 1000 e 1500 mg/ kg de peso corporal, em camundongos respectivamente.

Existem poucos estudos que indicam quais são os metabólitos secundários presentes na *C. ferrea*. Woldemichael (2002) e Frasson, (2003), detectaram nas folhas e casca do caule de *C. Férrea* flavonoides, saponinas, taninos, esteróis e compostos fenólicos.

Segundo Cavalheiro *et al* (2009), as saponinas estão presentes no extrato aquoso bruto dos frutos de *C. férrea*. Diante disso, sugere-se que uma possível concentração reduzida deste metabólico tenha contribuído para a não detecção da atividade genotóxica do jucá.

Frasson e colaboradores (2003) verificaram que no caule de *C. férrea* há uma baixa concentração de taninos e outros compostos fenólicos (menos de 1%), além das saponinas, os taninos também estão associados com a atividade genotóxica. Estes compostos atuam na captação de radicais livres pela intercepção de oxigênio ativo permitindo assim a formação de radicais estáveis), entretanto, existem poucos relatos na literatura sobre taninos e sua intervenção em processos patológicos (VARANDA, 2006).

Vale destacar que o efeito genotóxico quando observado nos diferentes estudos, é por diversas vezes dependente da dose do produto vegetal testado bem como pela própria interação entre os compostos ativos da planta (SPEROTTO *et al.*, 2008) Assim, a dose de 200,0 mg.kg⁻¹ por peso corpóreo testada neste estudo não apresentou danos genéticos em camundongos.

No presente trabalho, o grupo de animais tratado simultaneamente com a solução de Jucá e mitomicina C não apresentou diferença significativa na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos quando comparados ao grupo controle positivo ($p > 0,05$), indicando ausência de efeito protetor contra danos no DNA. Estudos experimentais *in vitro* em linhagens celulares de câncer de cólon indicaram a atividade protetora das saponinas contra o risco de desenvolvimento deste cancro. Esta atribuição se deu em virtude da redução de iNOS, prostaglandinas e COX-2, redução de translocações nucleares de subunidades de p50 e p65 do fator nuclear-KB e indução de apoptose por supressão da Bcl-2, além do aumento da expressão da proteína BAX (PUANGPRAPHANT *et al.*, 2011). Diante disso, é sugerível que uma baixa concentração de compostos genoprotetores (como as saponinas) e dependentes de dose, pode ter ocasionado na não detecção do efeito antigenotóxico do Jucá. Levando-se em consideração que este vegetal apresenta como principais constituintes as saponinas e taninos (WOLDEMICHAEL, 2002).

Somando ao teste do micronúcleo, foi realizado neste estudo o teste de mutagenicidade de Ames em *Salmonella Typhimurium* cepa TA 100 para avaliar as atividades mutagênicas e antimutagênicas da solução do Jucá. Os resultados obtidos mostram que a solução do jucá não foi mutagênica para a *Salmonella Typhimurium*

cepa TA100 em nenhuma das doses testadas. Entretanto, foi evidenciado um efeito protetor contra a ação da azida sódica na cepa TA 100 em todas as doses utilizadas.

Resultados semelhantes vão descritos por Lima (2010), onde o extrato das espécies *C. pyramidalis* e *C. ferrea* apresentou halo de inibição superior a 11mm e 17mm respectivamente frente a linhagens bacterianas de *Enterobacter Gergoviae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. A atividade antibacteriana de sementes de algumas espécies do gênero *Caesalpinia* também já foi descrita (SAEED & SABIR, 2002; AQIL & AHMAD, 2003). Esta atividade também foi verificada utilizando o extrato de frações obtidas do caule (FRASSON, 2002) e dos frutos (CARVALHO *et al.*, 1996) deste vegetal. Este efeito tem sido atribuído principalmente pela presença dos compostos fenólicos (como os taninos) presentes no gênero *Caesalpinia*, os quais são capazes de inibir a atividade de bactérias gram-positivas e gram-negativas (SAEED & SABIR, 2002).

Diante dos achados do presente estudo foi possível concluir que, em meio às condições experimentais empregadas, a solução aquosa do fruto do jucá não apresentou efeito mutagênico e antimutagênico.

7 CONCLUSÕES

- 1 - A solução aquosa do jucá apresentou atividade angiogênica na MCA.
- 2 - A solução aquosa do jucá não apresentou atividade mutagênica.
- 3 - A solução aquosa do jucá não apresentou atividade genotóxica e nem antigenotóxica.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Science, 2002.

ALBUQUERQUE, U. P. & HANAZAKI, N. 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. Rev. bras. farmacogn. 16(supl.): 678-89.

ALZUGARAY, D. Plantas que Curam. São Paulo: Hemus Press, 1984.

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

AMES, B.N. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. Proc Acad. Sci. v. 90, n. 1, p. 7915-7922, 1993.

AQIL, F, AHMAD. I. Broad-spectrum antibacterial and antifungal properties of certain traditionally used Indian medicinal plants. *World J Microb Biot* 19: 653-657. 2003.

BACCHI, E. M.; SERTIÉ, J. A. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Antiulcer Action and Toxicity of *Styrax Camporum* and *Caesalpinia Ferrea*. *Planta Médica*, Stuttgart, v. 61, n. 3, p. 204-207, 1995.

BAGATINI, M.D., SILVA, A.C.F., TEDESCO, S.B. 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 17: 444-447.

BALBINO, C. A., PEREIRA, L. M. & Curi R. 2005. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Brazil J. of Pharmaceutic Science*. 41(1):27-51.

BALBACH, A. As plantas curam. São Paulo: Três, 1972, p. 302-303.

BEDI, M.K; SHENEFELDT, P.D. Herbal therapy in dermatology. Arch. Dermatolod, 2002.

BENDAZZOLI, W.S. Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. Mundo Saúde, São Paulo, v.24, n.2, p.123-126, 2000.

BOLOGNESI, C.; LANDINI, E.; PERRONE, E.; ROGGIERI, P. 2004. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe. [557](#): 109-117.

BONASSI, S. ZNAOR, A. CEPPI, M. LANDO C. Na increase micrnucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of câncer in humans. Carcinogenesis Advance Access. 28: 625-640. 2007.

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

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

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 2 ed. São Paulo: Três, 1976. p. 45-56.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 2 ed. São Paulo: Três, 1976. p. 45-56.

BRAGANÇA, L.A.R. et al. Plantas medicinais antidiabéticas, Niterói: EDUFF, 1996. P. 172.

BRAGGIO, M.M., LIMA, M.E.L., VEASEY, E.A, HARAGUCHI, M. Atividades farmacológicas das folhas da *Sesbania virgata* (Cav.) PERS. Arq Inst Biol SP, v.69, p.49-53, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BROCKMAN HE, STACK HF, WATERS MD. Antimutagenicity profiles of some natural substances. *Mutat Res.* 1992;267:157-172.

BROWN, K.; KEMP, C.; BURNS, P.; BALMAIN, A. 1994. Importance of genetic alterations in tumour development. *Arch. Toxicol.* 16 (Suppl.): 253-260.

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

CALIXTO, J. B. et. al. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. *Expert Opinion Emerging Drugs*. v. 2, p. 261-279, 2001.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! *Ciência hoje*, [S.l.], v. 21, n. 1.234, p. 26-30, 1997.

CARVALHO, J. C. T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*.v. 53, p. 175-8, 1996.

CAVALHEIRO, M.G. et al. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia férrea* Mart., Leguminosae. Revista Brasileira de Farmacognosia. Abril/Junh. 2009.

CHU, E.; SARTORELLI, A.C. Quimioterapia do câncer. In.: KATZUNG, B.G. Farmacologia básica e clínica. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, cap. 55, p 751-777.

CHUNG, H.W.; KANG, S.J.; KIM, S.Y.A. 2002. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol. Mutat. Res., 516:49-56.

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

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

CRISCI. A. R.; SOARES, J.A.; BARROS, M.; GONÇALEZ, W.P.; JORGE, M.H.S. Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia férrea* ex. *TUL. Var ferrea* e da *Aloe vera* (L.) *Burm.f.* em lesões cutâneas totais em ratos. Revista Persp. Online: Biol.& saúde, Campos dos Goytacazes, 11 (3), 33-42, 2013.

CRONQUIST, A. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. 1981.

CUNHA, K.S.; REGULY, M.L.; GIMMLER, M.S.; GRAF, V.; ANDRADE, H.H.R. Tanic Acid is not Mutagenic in Germ Cells but Weakly Genotoxic in Somatic Cells of *D. Melanogaster*. Mutagenis. V.10, n.4, p.291-95, 1995.

DI CARLO, G. et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Science, V. 65p. 337-353, 1999.

DI STASI, L.C. Hiruma-Lima C. A, et al. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo, UNESP. 2002.

DING, G.R.; NAKAHARA, T.; MIYAKOSHI, J. 2003. Induction of kinetochore-positive and kinetochore-negative micronuclei in CHO cells by ELF magnetic fields and/or X-rays. *Mutagenesis*, 18:439-443.

DVORAK, H. F. 2005. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*. 20(21): 4638-80.

ELDIN, S. & DUNFORD, A. Fitoterapia na atenção primária a saúde. São Paulo: Manole; 2001.

ERDTMANN B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. *Genética Toxicológica*. 1 ed. Porto Alegre: Ed. Alconce, 2003.

FAIRBAIRN DW, OLIVE PL, O'NEIL KL. The comety assay: a comprehensive review. *Mutat Res*. 1995;339(1):37-59. 26-27.

FARNSWORTH N.R., AKERELE O., BINGEL A.S., SOEJARTO D.D., GUO. Z. 1985. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the WHO*, 63(6): 965-81.

FENECH, M. A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis*, v. 15, n. 4, p. 329-336, 2000b.69

FENECH, M. CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the

cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis*, v. 14, n. 6, p. 605-612, 1999.

FENECH, M. The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis. *Mutagenesis*, v. 20, n. 4, p. 255–269, 2005.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, v. 455, p. 81–95, 2000a.

FOLKMAN J. 1971. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*. 285:1182-1186.

FOLKMAN J. 1976. The Vascularization of Tumors. *Sci Am*. 234(5): 58-64.

FOLKMAN, J. & INGBER, D. 1992. Inhibition of angiogenesis. *Semin Carcer Biol*. 3(2):89-96.

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

FOLKMAN, J. IN: DE VITA, V.; HELLMAN, S; ROSEMBERG, S. A. 1991. *Biologic Therapy of Cancer*, J.B.Lippincott Co., Philadelphia, p. 743-53.

FOLKMAN, J., HAUDENSCHILD, C. 1980. Angiogenesis in vitro. *Nature*,. 228;551-6.

FOLKMAN, J.; SHING, T. Angiogenesis, 1992. *J. Biol. Chem*, 267, 10931-34

FRASSON, A. P. Z.; BITTENCOURT, C. F.; HEINZMANN, B. M.; Caracterização Físico-química e biológica do caule da *Caesalpinia ferrea* Mart.; *Revista Brasileira de Farmacognosia*; 2003.

GATEHOUSE DG, WILCOX P, FORSTER R, ROWLAND IR, CALLANDER RD. Bacterial Mutations Assays. In: KIRKLAND, D. J. Basic mutagenicity tests: UKEMS recommended procedures. New York, Ed. Cambridge University Press, 1990. Cap. 2, p.13-61.

GONZALEZ, R. P.; LEYVA, A. M.; RAMON, A. B.; MOREIRA, R.D.M.; PESSOA, C.; FARIAS, R.F.; MORAES, M.O. 2000. Método para o estudo in vivo da angiogênese: indução de neovascularização na córnea de coelho. *Acta Cir. Bras.* 15(3) [citado 15 maio 2008], p.00-00. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502000000300006&lng=pt&nrm=iso

GOUGH, N. R. 2007. Excessive Angiogenesis Inhibits Tumor Growth. *Sci. STKE* , 2007(367).

HARD, G.C. 1998. Mechanisms of chemically induced renal carcinogenesis in the laboratory rodent. *Mutag. Res.*, 239:104-112.

HASHIMOTO, G. Illustrated Encyclopedia of Brazilian Medicinal Plants. Kamakura: Abokk Press, 1996. p. 171—7.

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

HIJANO, J. Utilización de la técnica scale modificada para la transparencia y conservación de tejidos humanos y su proyección en la enseñanza de anatomia. *Revista Argentina de Anatomía Online* 2013 (Octubre – Noviembre – Diciembre), Vol. 4, Nº 4, pp. 114 – 153 ISSN impresa 1853-256x / ISSN online 1852-9348.

HORN, R. C.; VARGAS, V. M. F. Mutagenicity and Antimutagenicity of teas used in popular medicine in the salmonella/microsome assay. *Toxicology in vitro*, v. 22, n. 1, p. 1043-1049, 2008.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: EDUFSCAR, 2003. 152 p. (Série de textos da Escola de verão em química, vol. IV).

JONES, P.H.; CHRISTODOULOS, K.; DOBBS, N.; THAVASU, P.; BALKWILL, F.; BLANN, A.D.; CAINE, G.J.; KUMAR, S.; KAKKAR, A.J.; GOMPERTZ, N.; TALBOT, D.C.; GANESAN, T.S.; HARRIS, A.L.; 2004. Combination antiangiogenesis therapy with marimastat, captopril and fragmin in patients with advanced cancer. *British Journal of Cancer*. 5:(1):30-36.

JORGE, S.S.A. & MORAIS, R.G. Etnobotânica de plantas medicinais. UNESP, p 89-98. 2008.

KAEZER A. Análise da mutagenicidade e antimutagenicidade da *Ilex paraguariensis* (erva-mate) e seu efeito sobre o metabolismo de carcinógenos no esôfago de ratos Wistar. 2008. 141 f. Dissertação (Mestrado em fisiopatologia clínica e experimental) – Instituto de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

KARAKAYA, S.; KAVAS, A. Antimutagenic activities of some foods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, n. 79, p. 237-242, 1999.

KLINK C. A; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, v. 1, p. 147-155, 2005.

KUMAR, S. R.; VALLIKANNAN, B. Carotenoid composition and retinol equivalent in plants of nutritional and medicinal importance: Efficacy of β -carotene from

Chenopodium album in retinol-deficient rats. Food Chemistry, v. 19, p. 1584-1590, 2010.

LEWIN, Benjamin. Genes VII. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

LIMA, H.C., Queiroz, L.P., Morim, M.P., Souza, V.C. et al. (2010e). Fabaceae. Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000115>.

LIMA, C.R. & PACHECO, M.V. Temperatura e substratos na germinação de sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. Revista Brasileira de Sementes, vol 33, nº 2, p 216-222, 2010.

LORENT, M.T.; MARTOS, A.; CASTAÑO, A. 2002. Detection of Cytogenetic Alterations and Blood Cell Changes in Natural Populations of Carp. Ecotoxicology, 11: 27-34.

LORENZI, H. & Matos, F.J. A. Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas, 2002.

LORENZI, T. F. – Atlas de Hematologia, Guanabara Koogan, 2006.

LORENZI, Therezinha. Manual de hematologia: propedêutica e clínica. 2 ed. São Paulo: Medsi, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas. 2.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D&Z Computação Gráfica, Leitura & Arte, 413 p, 2004.

MARODIN, S. M.; BAPTISTA, L. R. de M.. O uso de plantas com fins medicinais no município de Dom Pedro de Alcântara, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v.4, n.1, p. 57-68, 2001.

MARON DM, AMES BN. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res.* 1983;113:173-215.

MARON, D. M.; AMES, B. N., 1983, Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113: 173-215.

MELO, J. G.; MARTINS, J. D .G. R.; AMORIM, E. L. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializadas no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.)Urban). *Acta bot. bras.*, v. 21, p. 27-36, 2007.

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

MITSCHER, L.A., DRAKE, S., GOLLAPUDI, S.R., OKWUTE, S.K. 1987. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. *Journal of Natural Products*, 50:1025-1040.

MOUSTACCHI, E. 2000. DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat. Res.*, 464:35-40.

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

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

NAKAMURA, E. S. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 81, n. 1, p. 135-137, 2002b.

NAKAMURA, E. S. Cancer chemopreventive effects of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters*, v. 177, n. 2, p. 119-124, 2002a.

NEVES MFJV. Avaliação do potencial genotóxico de uma mina de urânio abandonada. 2007. 62 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biologia da Universidade de Aveiro, Aveiro, 2007.

NORPPA, H. & FALCK, G.C.M. 2003. What do human micronuclei contain. *Mutagenesis*, 18 (3): 221-233.

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

NOVICK, A.; SZILARD, L. Anti-mutagens. *Nature*. V. 29;170(4335), p.926-7, 1952.

OLIVEIRA, Andreia Freitas. Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia férrea* (Tul.) Martius (Jucá) em lesões cutâneas de caprinos. Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-árido – UFERSA, RN, 2008.

OLIVEIRA, J. A. A.; Hyppolito, M. A.; Coutinho-Netto, J (2003). Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.*, 69 (5), 649-655.

ORTENCIO, B. Medicina Popular do Centro-Oeste. 2ª ed. 459p. Thesaurus. Brasília, 1997.

PAVAN-FRUEHAUF, Sandra. Plantas medicinais de mata atlântica: manejo sustentado e amostragem. São Paulo: Annablume: Fapesp, 2000.

PEREIRA, C. A. B. 1992. Plantas tóxicas e Introdução na veterinária. Editora UFG-Go.

PINHATTI, V.R. Avaliação das atividades biológicas e genotóxicas em dois derivados de guanilhidragona. UFRGS. Porto Alegre. 2009.

PIO CORRÊA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. p. 687.

PUANGPRAPHANT, S. & de MEJIA, E. G. (2011). Saponins in Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil) and quercetin synergistically inhibit iNOS and COX-2 in lipopolysaccharide-induced macrophages through NFjB pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8873–8883.

QUEIROZ, L. P. Leguminosas da Caatinga. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. 2009.

QUEIROZ, M. L. et al. Evaluation. of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. *Immunopharmacology & Immunotoxicology*, v. 23, n. 3, p. 367-382, 2001.

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

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, v. 80, p. 223-230, 1997.

RIBATTI, R., VACCA, A., RONCALI, L. & DAMMACCO, F. 1996. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for *in vivo* Research on angiogenesis. Int. J. Dev. Biol. vol. 40, p. 1189-1197.

RIBEIRO LR, MARQUES EK. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO LR, SALVADORI DMF, MARQUES EK. Mutagênese Ambiental. Editora ULBRA, p. 21 - 27, 2003.

RIBEIRO LR. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO LR, SALVADORI DMF, MARQUES EK. Mutagênese ambiental. Canoas: Ed. ULBRA, 2003, cap.7, p.173-200.

RIBEIRO, A. Q et al. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. Rev Bras Farmacogn, v. 15, n 1, p. 65-70, 2005.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do Bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. Cerrado: ambiente e flora. Embrapa Cerrados, Planaltina, 1998.

RIBEIRO, L.R. 2003. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D. M. F.; Marques, E. K. Mutagênese Ambiental. Editora ULBRA, p. 173-200.

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

RIZZINI, C.T. Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira. Edgard Blucher, São Paulo.1990.

ROBERTSON, C. The use of honey in ancient Egyptian medicine. Em, Cruse, P.(Ed.), Proceedings of the 7th Annual History of Medicine Days Conference. Mar. 26-27; Calgary AB. Calgary, p. 21-4.1998.

RIBEIRO, S. S., BUITRÓN, X., HELENA, L. O. & VINÍCIUS, M. M. 2001. Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio. Disponível em: <www.traffic.org>. Acesso em: 22 Jul. 2014.

ROSEFORT, C.; FAUTH, E.; ZANKL, H. 2004. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. *Mutagenesis*, 19: 277-284.

ROY, .M.; CHAKRABARTY, S.; SINHA, D.; BHATTACHARYA, R. K.; SIDDIQI, M. 2003. Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of pigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. *Mutat. Res.*, 523-524: 33-41.

SADER, S. L.; COUTINHO-NETTO, J.; BARBIERI-NETTO, J.; MAZZETTO, S. A.; ALVES-JR., P.; VANNI, J. C.; SADER, A. A. 2000. Substituição parcial do pericárdio de cães por membrana de látex natural. *Rev Bras Cir Cardiovasc.* 15: 338-344.

SAEED, M. A, SABIR, A.W 2002. Antibacterial activity of *Caesalpinia bonducella* seeds. *Fitoterapia* 72: 807-809.

SAFATLE, A.M.V.; BARROS, P.S.M.; MALUCELLI, B. E. GUERRA, J.L. 2002. Implante de duas membranas biológicas em microbolsa corneana como modelo experimental de angiogênese. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 39(4):189-195.

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.

SIKIC, B.I. Fármacos antineoplásicos, in.: CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E. *Farmacologia moderna com aplicações clínicas*. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, cap. 56, p. 601-618.

SIMÕES, C.M.O, SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2002; 12(1):35-40.

SNUSTAD, D.P. e SIMMONS, M.J. Fundamentos de genética. 2° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2001.

SOERJATO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspective from field. *Journal of Ethnopharmacology*, v.51, p.1-15, 1996.

SOUZA, D.S. et al. Estudo do potencial mutagênico do extrato de tamarindus indica em células da medula óssea de ratos Wistar. In.: Seminário de Iniciação Científica. 5. Alfenas, 2006.

SUHR YJ. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res.* 1999;428:305-327.

SUZUKI DT, GRIFFITHS AJF, MILLER JH, LEWONTIN RC. Introdução à Genética. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4 ed., 1992. 633p.

TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vivo and in vitro assays. *Genet. Mol. Biol.*, v.26, n.4 p.551-555, 2003.

TEJS S. The Ames test: a methodological short review. *Environ Biotechnol.* 2008;4(1):7-14.

TRIPATHI, K.D. Agentes antineoplásicos. In.: *Farmacologia médica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 60, p. 675-686.

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

VALENT GU. Avaliação da atividade mutagênica de extratos orgânicos de corpos d'água no estado de São Paulo através do Teste de Ames. 1990. 149 f. Tese (Doutorado em Biologia) – Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1990.

VARGAS, A.; ZEISSER-LABOUËBE, M.; LANGE, N. GURNY, R.; DELIE, F. 2007. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 1162-1176.

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

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. *Rev. bras. farmacogn.*, 18(2):308-313.

VIEIRA, I. F. R; LEAL, A. S.; KRAMBROCK, K. et al. Identificação de plantas medicinais irradiadas através da ressonância paramagnética eletrônica. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 10, n. 1, p. 63-69, 2007.

VOGEL EM. *Introduction into Basic Principles of Genetic Toxicology*. Nitherlands: Leinden, 1989.

WANG, S.; ZHENG, Z.; WENG, Y.; YU, Y.; ZHANG, D.; FAN, W.; DAI R, H. U. Z. 2004. Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. *Life Sci*. 74: 2467-2478.

WATERS, M.D.; STACK, H.F.; JACKSON, M.A.; BROCKMAN, H.E.; FLORA, S. 1996. Activity profiles of antimutagens: *in vitro* and *in vivo* data. *Mutat Res*. 350(1): 109-129.

WATSON JD, BAKER TA, BELL SP, GANN A, LEVINE M, LOSICK R. Mutabilidade e Reparo de DNA. In: _____. *Biologia Molecular do Gene*. 5 ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2006.

WOLDEMICHAEL, G. M.; SINGHB, M. P.; MAIESEB, W. M.; TIMMERMANN, B. N.. Constituents of Antibacterial Extract of *Caesalpinia paraguariensis* Burk. September 12, 2002.

YUNES, R.A. & CALIXTO, J. B. 2001. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. 500 p. Editora Argos.

ZWADLO-KLARWASSER, G., GÖRLITZ, K., HAFEMANN, B., KLEE, D. and KLOSTERHALFEN, B., 2001. The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of angiogenic and inflammatory response to biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 12, no. 3, p. 195-199.

APÊNDICE A

PROTOCOLO – TESTE DO MICRONÚCLEO EM MOH DO CAMUNDONGO

Reagentes e Soluções

Solubilização das células

- As células provenientes da MOH de camundongos foram solubilizadas em soro fetal bovino, produzindo por Laborclin Produtos para Laboratórios.

Fixador

- Metanol absoluto – Laboratórios.

Tampão Fosfato (pH 6,0)

- Fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 12 \text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich Chemical Company.
- Fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$), Sigma-Aldrich Chemical Company.

Composição do tampão fosfato pH 6,0

Solução A	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 12 \text{H}_2\text{O}$	17,9 g
Água destilada	100 ml
Solução B	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$	344,5g
Água destilada	500ml

Tampão fosfato pH 6,0

Solução A.....	74 ml
Solução B.....	426 ml
Água destilada.....	1.500 ml

Corante

- Tampão fosfato pH 6,0
- Giemsa, Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios

Composição do Corante Giemsa tamponado *

Tampão fosfato pH 6,0.....	100 ml
Água destilada.....	100 ml
Solução Giemsa.....	9 ml

*Filtrado em papel filtro

Controles**Controle positivo**

- Mitomicina (MMC), Bristol-Myers Squibb

Solução de Mitomicina C

Mitomicina C.....	5mg
Água destilada estéril.....	5ml

Controle negativo

- Água destilada estéril

APÊNDICE B
PROTOCOLO – TESTE DE MUTAGENICIDADE DE AMES EM CEPAS DE
SALMONELLA TYPHIMURIUM

Solução de sais de Vogel-Bonner

Sulfato de magnésio P.A.....	1g
Ácido Cítrico monohidratado P.A.....	10g
Fosfato de potássio dibásico P.A.....	50g
Fosfato de sódio e amônio P.A.....	15,5g
Água destilada.....	65mL

Solução de Dextrose 40%

Dextrose P.A.....	40 g
Água destilada.....	60 mL

Meio Mínimo Glicosado (placa-teste)

Ágar.....	15 g
Solução de sais de Vogel-Bonner.....	20 mL
Solução de dextrose a 40%.....	50 mL
Água destilada.....	930 mL

Para a preparação do Meio Mínimo Glicosado (placa-teste) foram distribuídos 30 mL do meio de cultura em placas de Petri que foram colocadas em repouso por 12 h em estufa a 37°C para posterior utilização.

Solução de histidina

Histidina.....	50mg
Água destilada.....	10mL

Solução de biotina

Biotina.....	18 mg
Água destilada.....	125 mL

Placa Máster

Ágar.....	7,5 g
Solução de sais de Vogel-Bonner	10 mL
Solução de dextrose 40%	25 mL
Solução de biotina	3mL
Solução de histidina	5 mL
Água destilada	500 mL

Solução de histidina/biotina 0,5 mM

D-Biotina.....	62 mg
L.Histidina	48 mg
Água destilada	500 mL

Água de superfície com traços de histidina/biotina (top-ágar)

Ágar Bacto	3g
Cloreto de Sódio (NaCl)	2,5 g
Solução de histidina/biotina 0,5 mM	50 mL
Água destilada	500 mL

Caldo Nutriente

Caldo Nutritivo	5g
Água destilada	200 mL

ANEXO

APROVAÇÃO COMITÉ DE ÉTICA



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 25 DE AGOSTO DE 2014 E CONSIDERADA
APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

1)

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

2)

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

3)

Profa. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura / PUC Goiás (Membro)

4)

Prof. Dr. Wilson de Melo Cruvinel / PUC Goiás (Membro)