



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE IPAMERI
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal



**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E
POTENCIAL ANGIOGÊNICO DO LÁTEX DE
*Hancornia speciosa***

THUANNE PIRES RIBEIRO

**M
E
S
T
R
A
D
O**

**Ipameri-GO
2014**

THUANNE PIRES RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATILIDADE E POTENCIAL ANGIOGÊNICO
DO LÁTEX DE *Hancornia speciosa***

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciane Madureira de Almeida

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Goiás – UEG, Unidade Universitária de Ipameri como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação em Produção Vegetal para obtenção do título de MESTRE.

Ipameri-GO
2014

Ribeiro, Thuanne Pires.

Avaliação da biocompatibilidade e potencial angiogênico do látex de *Hancornia speciosa*- 2014. 66f.il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luciane Madureira de Almeida.

Dissertação (mestrado)- Universidade Estadual de Goiás, 2014.

Bibliografia: 1. Produção Vegetal. 2. Agronomia. 3. Ueg.
I.Título



Unidade Universitária de Ipameri
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Vegetal
Rodovia GO 330, Km 241, Anel Viário, 75780-000 Ipameri-GO
www.ppgpv.ueg.br e-mail: ppgpv.ipameri@gmail.com
Fone: (64)3491-5219



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E POTENCIAL ANGIOGÊNICO DO LÁTEX DE *Hancornia speciosa*

AUTORA: Thuanne Pires Ribeiro

ORIENTADORA: Luciane Madureira de Almeida

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL, pela comissão Examinadora:

Luciane Madureira de Almeida

Prof.^a Dr.^a LUCIANE MADUREIRA DE ALMEIDA
Universidade Estadual de Goiás/Ipameri-GO

Nedenia Bonvino Stafuzza

Prof.^a Dr.^a NEDENIA BONVINO STAFUZZA
Universidade Estadual Paulista/ São José do Rio Preto-SP

Joelma Abadia Marciano

Prof.^a Dr.^a JOELMA ABADIA MARCIANO
Universidade Estadual de Goiás/Anápolis-GO

Data da realização: 24 de janeiro de 2014.

*Dedico a Deus por ter me dado minha família e amigos e
a minha família e amigos por terem me permitido ser o que sou.*

Agradecimentos

Um sonho está sendo realizado, e posso garantir que da melhor maneira possível!

Primeiramente agradeço a Deus que me iluminou, deu força, sabedoria e dedicação ao longo deste trabalho, que me proporcionou tantas experiências proveitosas. Aos meus pais Divaldo Divino Ribeiro e Heleodora Pires Ribeiro pelo exemplo de vida e pelos ensinamentos valiosos, ambos referência de caráter, humildade e amor incondicional. Agradeço pelo carinho, paciência e dedicação nas épocas de dificuldades e por sempre acreditarem em mim e à minha irmã Marina Pires Ribeiro pelo apoio, amizade e companheirismo. Agradeço por tê-los sempre comigo! Amo vocês!

Em segundo lugar gostaria de agradecer a minha orientadora Luciane Madureira de Almeida, por ter confiando em mim, pelo carinho, disponibilidade, paciência e pela credibilidade e oportunidade de realizar este trabalho. E também por ter me acolhido durante esses dois anos sendo como uma segunda mãe, amadureci e cresci bastante nesses últimos anos e devo isso principalmente a ela, pelos ensinamentos que a mim foram transferidos.

Às minhas amigas Paola e Renata que se tornaram minhas irmãs. Obrigada pela convivência, paciência, amor, carinho, os momentos que passamos juntas vão ficar pra sempre guardados em meu coração e os meus irmãos de república Lúcio, João Henrique e Hugo, que apesar do pouco tempo de convivência se tornaram indispensáveis, sendo minha segunda família aprendi muito com cada um de vocês. E podem ter a certeza que sem vocês não seria a mesma coisa.

Agradeço a amizade, o carinho, companheirismo de Pedro Vilela, Egberto, Macksuel, Eurípedes, Mariana, Flávia, Pedro Augusto, Jocasta, Naianne, Carol, Natália, Wesley e Thiago que se tornaram pessoas tão especiais em minha vida. Agradeço por todo apoio, carinho e alegrias que me proporcionaram. E aos meus amigos de infância Lucas e Desuita por estarem presente apesar da distância e por compreenderem minha ausência em determinados momentos.

Aos companheiros de laboratório, Angélica, Cássia, Fabrício pela convivência e aprendizado. E em especial ao Tiago que me apoiou totalmente na realização deste trabalho.

Aos professores da Universidade Federal de Goiás, Pablo José Gonçalves e Ruy de Souza Lino Júnior, ao professor da Universidade Católica de Goiás, Paulo Melo-Reis, e a professora da Universidade Estadual de Goiás, Alcione Arruda, pelo apoio e contribuição na realização deste trabalho. Seus ensinamentos foram valiosos, aprendi muito com cada um de vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro. Enfim a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Obrigada!
Amo Vocês!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Biomateriais e suas aplicações.....	01
1.2. Látex de plantas.....	02
1.3. Látex de seringueira: um excelente biomaterial para regeneração de tecidos.	03
1.4. Mangabeira.....	05
1.5. Citotoxicidade.....	10
1.6. Genotoxicidade.....	10
1.7. Avaliação da biocompatibilidade de uma substância: teste de <i>Allium cepa</i>.....	11
1.8. Avaliação da biofuncionalidade de uma substância: teste CAM.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo Geral e específicos.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1. Material biológico.....	14
3.2. Avaliação da biocompatibilidade.....	14
3.2.1. Obtenção de <i>Allium cepa</i>	15
3.2.2. Grupos experimentais.....	15
3.2.3. Procedimentos.....	15
3.2.4. Preparo das lâminas.....	15
3.2.5. Análise das lâminas.....	16
3.2.6. Análise estatística.....	16
3.3. Avaliação da biofuncionalidade.....	16
3.3.1. Obtenção dos ovos fertilizados.....	16
3.3.2. Substâncias utilizadas.....	16
3.3.3. Experimento.....	iv
3.3.4. Obtenção e análise das imagens.....	17
3.3.5. Análises estatísticas.....	17

3.3.6. Análises histológicas.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	19
4.1. Avaliação da biocompatibilidade.....	19
4.1.1. Teste de <i>Allium cepa</i>	19
4.2. Avaliação da biofuncionalidade.....	22
4.2.1. Teste da membrana corioalantóide (CAM) de ovos de galinha fertilizados.....	22
4.2.2. Análise histológica.....	25
5. CONCLUSÃO.....	30
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	31
7. ANEXO.....	38

RESUMO

As plantas são fontes promissoras de novos compostos bioativos, especialmente no campo medicinal. Uma importante descoberta para a área de biomateriais aplicados à medicina refere-se ao látex de *Hevea brasiliensis* (seringueira) que tem alta capacidade de regenerar tecidos (angiogênese) e também é biocompatível com sistemas vivos. Contudo, alguns indivíduos podem apresentar reações alérgicas às proteínas do látex de seringueira, limitando sua aplicação. Dessa forma pesquisadores investigam outras espécies lactíferas, as quais possuam menor teor de proteínas e possam produzir látex com menor potencial alergênico. O látex de *Hancornia speciosa* Gómez poderia ser uma alternativa uma vez que a sua carga de proteínas é inferior ao látex de seringueira. *Hancornia speciosa* Gómez, popularmente conhecido como Mangabeira, é uma planta frutífera com ampla distribuição no Brasil. O látex da planta é utilizado na medicina popular no tratamento de diversas doenças como tuberculose, disfunção hepática, úlceras, verrugas e dermatite. No presente estudo foi avaliada a biocompatibilidade e o potencial angiogênico do látex de mangabeira. Para isso foram utilizados dois ensaios diferentes: o teste do *Allium cepa* e o teste da membrana corioalantóide de ovos de galinha fertilizados (CAM). O teste de *Allium cepa* mostrou que o látex de mangabeira não é citotóxico e nem genotóxico sendo biocompatível a sistemas vivos. Já o ensaio CAM mostrou um aumento significativo da rede vascular nas amostras submetidas ao látex de mangabeira evidenciando seu potencial angiogênico. Os resultados obtidos na histologia da CAM comprovam o potencial angiogênico do látex. Este estudo contribui para a compreensão das potencialidades do látex de mangabeira como fontes de novos medicamentos. Agregando assim valor econômico a essa espécie, a qual tem sido utilizada principalmente para obtenção de frutos.

Palavras-chave: Angiogênese; Biomaterial; Citotoxicidade; Mangaba; Genotoxicidade.

ABSTRACT

Plants are promising sources of new bioactive compounds, especially in the medical field. An important discovery in the area of biomaterials applied to medicine is that the natural rubber from *Hevea brasiliensis* has potential to regenerate tissues (angiogenesis) and is also biocompatible to living systems. However, some individuals present allergy to natural rubber proteins, which restrain its application. Thus researchers have been looking for other lactiferous species with lower allergenic potential. The mangabeira latex could be an alternative, since its amount of protein is lower than natural latex rubber. The latex obtained from *Hancornia speciosa*, a plant native to Brazil popularly known in Portuguese as “mangabeira”, is used in folk medicine for treatment of several diseases, such as acne, warts, diabetes, gastritis and inflammation. In this work, we describe the biocompatibility assessment and angiogenic properties of *H. speciosa* latex and its potential application in medicine. The biocompatibility was evaluated through cytotoxicity and genotoxicity in *Allium cepa* model and the angiogenic properties were evaluated using the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay model. As results the cytotoxicity and genotoxicity assays showed that *Hancornia speciosa* latex is biocompatible with life systems and can be a good biomaterial for medical applications. The CAM test showed the efficient ability of *Hancornia speciosa* latex in neovascularization of tissues. The histological analysis was in accordance with the results obtained in the CAM assay. Our data indicate that the latex obtained from *H. speciosa* and eluted in water showed significant angiogenic activity without any cytotoxic or genotoxic effects on life systems. This study contributes to the understanding of the potentialities of *Hancornia speciosa* latex as a source of new phytomedicines.

Key-words: Angiogenesis; Biomaterial; Cytotoxicity; Genotoxicity; Mangaba.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biomateriais e suas aplicações:

Nas últimas décadas, os biomateriais têm recebido grande atenção, tanto da comunidade científica como tecnológica, os quais vêm sendo empregados em diversos procedimentos relacionados ao tratamento de queimaduras (FRADE et al., 2010), restauração de artéria (BRANDÃO et al., 2007), cicatrização óssea (SILVA et al., 2006), recuperação de tímpanos (OLIVEIRA et al., 2003), reparo de defeitos diafragmáticos (RODGERS et al., 1981; SCHAIRE & KEELEY, 1957), entre outras aplicações.

Classifica-se como biomaterial qualquer material não vivo utilizado na medicina capaz de interagir com um sistema vivo com objetivo de reparar perdas teciduais e restaurar funções comprometidas por processos degenerativos ou traumatismo (HENCH, 2006).

Biomateriais são considerados ideais quando possuem baixo custo de produção, de fácil manipulação, promovem crescimento dos tecidos, são resistentes às infecções, não induzem resposta inflamatória exacerbada, não promovem a formação de aderências e fístulas e não possuem suas características físicas alteradas pelos líquidos tissulares (CERISE et al., 1974). Os biomateriais devem ainda ser flexíveis, inertes, porosos, resistentes e principalmente biocompatíveis com os sistemas vivos (RODGERS et al., 1981).

A biocompatibilidade ocorre quando os tecidos entram em contato com um determinado material e não manifestam qualquer tipo de experiência tóxica, irritante, inflamatória, alérgica ou de fundo mutagênico (KAO et al. 2011). Entretanto, não é apenas a ausência de efeito tóxico que descreve o termo biocompatibilidade, mas também a presença de uma influência positiva em termos de biofuncionalidade (WIEGAND & HIPLER, 2008). Algumas das funcionalidades de um biomaterial são as propriedades de antiangiogênese e angiogênese.

A antiangiogênese é o processo pelo qual há a inibição da formação de vasos sanguíneos impedindo assim o crescimento de novas artérias e veias (GONZALEZ et al., 2003; SAFLATE et al., 2002). Essa inibição pode ocorrer artificialmente pelo uso de alguns medicamentos, tais como os utilizados no tratamento do câncer. Entre esses medicamentos pode-se citar a dexametasona, medicamento pertencente à classe dos corticosteróides, que atuam no controle da velocidade de síntese de proteínas, sendo utilizado no tratamento de condições patológicas como isquemia cerebral. Além da dexametasona, existem outros medicamentos como o decloridrato de erlotinibe (Tarceva[®]), medicamento utilizado para o controle do câncer de pulmão; endostatina que é derivada do colágeno XVII (fragmento c terminal com 183 resíduos de aminoácidos- 20KDa) e angiostatina (derivada do plasminogênio 38 KDa), esses fragmentos ocorrem naturalmente no organismo e são

utilizadas para a regressão tumoral; TNP-470 e a talidomida, que são inibidores seletivos das células endoteliais; o pegaptanib, é um oligonucleotídeo que atua como um anticorpo no espaço extracelular inibindo a angiogênese (VEDULA et al., 2008), entre outros.

Angiogênese é o processo pelo qual novos vasos sanguíneos são desenvolvidos a partir de vasos pré-existentes (RIBATTI et al., 2001). Na medicina moderna há inúmeros biomateriais com a capacidade de promover a angiogênese, entre eles pode-se citar cremes que estimulam a cicatrização de feridas, como é o caso do Regederm® (PELE NOVA, 2013), catéteres para implantes de coração (CALLAHAN & NATALE, 2008), scaffolds para a engenharia tecidual (MATSUMOTO et al., 2007; SALGADO et al., 2004), malhas sintéticas ou biossintéticas para reparo de lesões na parede abdominal (SCOTT & VANHOUTTE, 2002; ZIEREN et al., 1998). Dentre os vários biomateriais com potencial angiogênico os quais vêm sendo utilizados na medicina hoje em dia, o látex de plantas vêm recebendo destaque.

1.2 Látex de plantas

Embora milhares de espécies vegetais sejam utilizadas na medicina tradicional no mundo, estima-se que apenas 1% dessas tenham seu valor terapêutico demonstrado por meio de estudos científicos (PRIMACK, 1993). De acordo com Agra et al. (2007) o látex de diferentes espécies vem sendo utilizado para tratamento de inúmeras enfermidades na medicina popular, tais como: *Plumeria rubra* L. (jasmin vermelho), *Castilla elástica* S. (árvore da borracha do Panamá), *Parthenium argentatum* L. (guayule), *Synadenium umbellatum* Pax. (cola nota), *Jatropha mollissima* Baill. (pinhão-bravo) e *Jatropha gossypifolia* L. (pinhão-roxo).

O látex representa o conteúdo citoplasmático de um sistema de células especializadas, conhecidas como laticíferos (AZZINI et al., 1998). O látex é uma solução coloidal polidispersa, onde as partículas de borracha (poli isopropeno) encontram-se dispersas em um meio aquoso. Nesse meio aquoso, a água representa 50 a 70% do peso/volume. O isopropeno (Figura 1) é envolvido por uma camada interna de fosfolipídios e outra externa de proteínas, que confere carga negativa a partícula. Além das partículas de borracha e suas camadas lipoprotéicas, cerca de 3 a 5% do peso/volume do látex é composto por substâncias do tipo não-borracha, como os aminoácidos, sais inorgânicos, ácidos nucleicos, carboidratos, ácidos graxos, etc (PERRELLA, 2002).

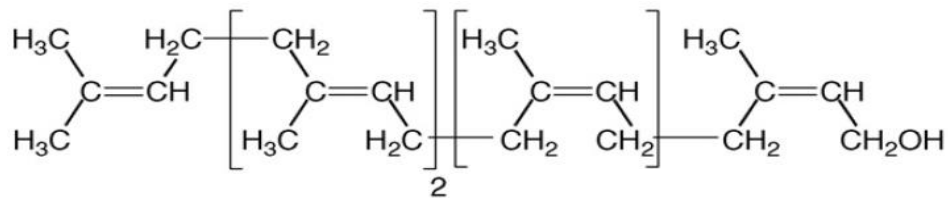


Figura 1: Estrutura do polímero do isopreno (PERRELLA, 2002).

O látex natural é um material biocompatível com alta resistência mecânica, apresenta elasticidade, baixo custo e acelera o processo de angiogênese (ERENO, 2006). Uma importante descoberta para a área de biomateriais aplicados a medicina é que o látex de seringueira tem alta capacidade angiogênica, além de ser biocompatível a sistemas vivos (MRUÉ, 2000).

1.3 Látex de seringueira: um excelente biomaterial para regeneração de tecidos

A seringueira pertence ao gênero *Hevea*, família Euphorbiaceae e tem como área de ocorrência e dispersão natural a Amazônia brasileira e países próximos, como Bolívia, Colômbia e Peru (MRUÉ, 2000). A seringueira, *Hevea brasilienses*, vêm sendo utilizada há várias décadas para obtenção de látex o qual possui diversas finalidades desde a produção de borracha até o seu uso como biomaterial na medicina moderna (HENCH, 2006).

O látex de seringueira apresenta importantes propriedades biológicas, tais como: atividade angiogênica, promoção de adesão celular e formação de matriz celular, atividade neovascular. Essas propriedades aceleram a reparação de tecido e proporcionam sensível abreviação no tempo de tratamento com substancial vantagem econômica e de qualidade de vida (BEEZHOLD et al., 1995). O uso do látex também possui a vantagem de menor risco de transmissão de doenças em relação aos materiais provenientes de tecidos animais (MRUÉ, 2000).

Trabalhos iniciais com látex de seringueira envolviam o uso de uma biomembrana formada a partir da simples secagem do látex a aproximadamente 50°C. A biomembrana de látex da seringueira, com finalidade terapêutica foi desenvolvida pelo Prof. Dr. Joaquim Coutinho Netto em 1996, no Laboratório de bioquímica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) de Ribeirão Preto/SP, no qual foi reportado o primeiro resultado da sua utilização experimental como substituto do esôfago cervical de cães. As propriedades indutoras de regeneração tecidual da biomembrana de látex estimularam a sua utilização como substituto parcial do pericárdio de cães. Em trabalho experimental, os autores observaram que nos grupos nos quais este material foi utilizado, a ocorrência de aderências

aos tecidos adjacentes foi menor do que no grupo controle, tendo havido regeneração completa do pericárdio subjacente à membrana de látex, com características semelhantes às do pericárdio original (MRUÉ, 1996).

As propriedades indutoras de regeneração tecidual da biomembrana de látex já foram relatadas em vários outros trabalhos, tais como na restituição da membrana timpânica em humanos (ARAÚJO et al., 2012), restituição da retina de coelho (SAMPAIO et al., 2010); neovaginoplastia em humanos (CARVALHO et al., 2008); regeneração de ossos em coelhos (ERENO et al., 2006); restituição alvéolo dental de ratos (BALABANIAN et al., 2006).

A partir do sucesso das aplicações desta biomembrana foi criada um produto na forma de bandagem, chamado Biocure[®]. Esse produto foi patenteado em 2009, sob o número US 2009/0093404, e deu origem a empresa Pele Nova, a qual explora e utiliza as propriedades e produtos originados do látex. Atualmente, o Biocure teve sua fabricação descontinuada e foi substituído por outra formulação em creme-gel, chamada de Regederm[®]. O Regederm[®] é um gel-creme utilizado para recomposição cutânea indicado no tratamento e cicatrização de feridas cutâneas abertas, independente da etiologia, o qual estimula a regeneração da pele e pode curar certas feridas crônicas em apenas dez dias (PELE NOVA, 2013).

Apesar dos expressivos resultados obtidos por meio do látex de seringueira, há uma restrição em relação ao seu uso. Algumas pessoas apresentam alergia a produtos obtidos do látex de seringueira. Nos últimos anos houve um aumento expressivo das reações alérgicas ao látex de seringueira e é aceito que 1 a 6 % da população sofrem de alergia a produtos feitos com esse material (ALMEIDA et al., 2005). Outro estudo mostrou que até 17% dos profissionais de saúde possuem algum tipo de reação alérgica ao látex (BOUSQUET et al., 2006).

Essas reações são provenientes de pelo menos 13 proteínas presentes no látex de seringueira como é o caso das proteínas *HevB1* e *HevB3*, que são proteínas abundantes e associadas a elasticidade do látex (BEILEN & POIRIER, 2007; BOUSQUET et al., 2006). Esse é um dos principais motivos da busca por outras espécies lactíferas.

Além de causar alergia, outro problema relacionado ao uso exclusivo do látex de seringueira, é o uso de apenas uma fonte para extração de borracha natural no mundo. Uma vez que o látex da seringueira é o único utilizado para a confecção de mais de 40.000 produtos, incluindo mais de 400 dispositivos médicos, luvas cirúrgicas, pneus, produtos de consumo entre outros, o que leva a uma falta do látex no mercado interno sendo necessário importar o látex de outros países. Além do mais, a colheita da borracha, não pode ser mecanizada, exigindo a exploração diária de centenas de árvores por cada trabalhador. Outra preocupação em relação à seringueira é a doença fungica denominada mal das folhas sul-

americano (SALB), que afeta a produção do látex e pode vir a ter efeito devastador. Atualmente, a única barreira para impedir a propagação de SALB é uma rigorosa quarentena, a qual pode falhar em algum momento (DAVIS, 2011). Sendo assim, é necessária a busca por outras espécies que venham a serem outras fontes para extração de material vegetal biológico.

Um material alternativo poderia ser o látex de mangabeira, uma planta do cerrado que já vem sendo utilizada na farmacologia caseira no tratamento de diversas doenças (ALOUFA et al., 2003). Uma das vantagens do uso da mangabeira seria a possibilidade desta planta produzir um látex com propriedades angiogênicas e com menor potencial alergênico, uma vez que a quantidade de proteínas do látex de mangabeira é inferior ao látex de seringueira (MALMONGE et al., 2009).

1.4 Mangabeira

A *Hancornia speciosa* Gómez, é o nome científico da espécie conhecida popularmente como mangabeira (LORENZI, 1992). Essa é uma planta perenifólia, frutífera, de clima tropical, constituída de copa irregular, tronco tortuoso, bastante ramificado e áspero (Figura 2). Os ramos são lisos e avermelhados e a raiz é pivotante profunda, circundada de raízes secundárias bem desenvolvidas. Possui folhas simples, opostas, ovais ou lanceoladas, pecioladas e de consistência coriácea (LEDERMAN et al., 2000). Apresenta inflorescência no ápice dos ramos, com duas a cinco flores hermafroditas de coloração branca, de três a quatro centímetros de comprimento. As sementes da mangabeira são discóides, achatadas, com sete a oito milímetros de diâmetro, de cor castanho-clara, rugosas com hilo central. As sementes são consideradas recalcitrantes, isto é, não suportam ressecamento, perdendo rapidamente o poder germinativo assim que são retiradas do fruto (VIEIRA NETO, 2002).



Figura 2: Imagens da *Hancornia speciosa*. 1) árvore (Mangabeira); 2) Folhas; 3) inflorescência e 4) fruto (Mangaba).

No Brasil a mangabeira é encontrada em vários estados (Figura 3), estendendo-se pela Costa Atlântica desde o Amapá e o Pará, nos tabuleiros costeiros e nas baixadas litorâneas do Nordeste, até o Espírito Santo, por toda a região de Cerrado do Brasil Central até o Pantanal (LEDERMAN et al., 2000).



Figura 3: Mapa regiões de ocorrência da mangabeira no território brasileiro. Fonte: Embrapa 2009.

A mangabeira foi descrita pela primeira vez por Gomes em 1812, pertencendo à classe Dicotyledonea, ordem Gentianales, família Apocynaceae, gênero *Hancornia*, o qual é considerado monotípico com a única espécie *Hancornia speciosa* (LEDERMAN et al., 2000). De acordo com Monachino (1945) são aceitas as seis variedades botânicas as quais são classificadas principalmente pelas características de folhas e flores. Abaixo a classificação.

1) *H. speciosa* Gomes (variedade típica) ou *H. speciosa* variedade *speciosa*: possui folhas glabras, com pecíolo de 0,9 a 0,15 cm de comprimento e limbo foliar com até 6 cm de comprimento e 2 cm de largura. Sua distribuição geográfica inclui os estados da Bahia, Piauí e Maranhão.

2) *H. speciosa* variedade *maximiliani*: possui o limbo com comprimento e largura um pouco menor e o pecíolo um pouco mais curto que a variedade típica; pecíolo com cerca de 0,8 cm de comprimento; limbo de 5 cm a 6 cm de comprimento e 2 a 2,5 cm de largura. Localiza-se principalmente no estado de Minas Gerais.

3) *H. speciosa* variedade *cuyabensis*: possui pecíolo com cerca de 0,3 cm a 0,5 cm de comprimento; limbo de 4 a 10 cm de comprimento e 1,5 a 3 cm de largura; cálice glabro externamente, corola grande, glabra externamente. Está presente principalmente no estado do Mato Grosso.

4) *H. speciosa* variedade *lundii*: pecíolo com 0,3 a 0,5 cm de comprimento; limbo com 5 cm a 7 cm de comprimento e 3 cm de largura; pedicelos pubescentes; cálice cerdoso-pubescente na parte inferior da nervura central. Localiza-se principalmente no estado de Minas Gerais.

5) *H. speciosa* variedade *pubescens*: ramos densamente pubescentes; pecíolos curtos; limbo pubescente na parte inferior, com 6 a 12 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura; corola maior com lóbulos cerdosos pubescentes, tubo pubescentes externamente. É encontrada principalmente nos estados de Goiás e Minas Gerais.

6) *H. speciosa* variedade *gardneri*: também possui folhas glabras, enquanto a *pubescens* tem folhas pilosas. Ambas apresentam pecíolos de 0,3 a 0,5 cm de comprimento e limbo foliar de 6 a 12 cm de comprimento e 3 a 6 cm de largura, frutos maiores e de coloração verde predominante, estando presente em todo o Estado de Goiás.

Apesar de existir grande diversidade morfológica entre as linhagens de mangabeira, pouco se sabe a respeito da biologia, variabilidade genética da planta e da produção de látex (MOURA, 2003). Por isso são necessários trabalhos que avaliem a variabilidade e a caracterização da mangabeira.

O valor dos recursos genéticos de uma espécie, em dada região, está diretamente relacionado com a magnitude da variabilidade genética disponível. Neste aspecto, informações sobre a variabilidade genética das populações constituem uma base essencial para o aproveitamento desse recurso (CHAVES & MOURA, 2003). A mangabeira apresenta pouca segregação conservando muito do patrimônio genético. Dessa maneira, a erosão genética é baixa e o germoplasma se mantém nessas condições com todo o seu potencial (LEDERMAN et al., 2000).

O interesse na cultura da mangabeira vem crescendo nos últimos anos, sendo o principal interesse comercial no fruto, o qual é denominado mangaba. O mesmo pode ser consumido *in natura* ou processado como geléias, doces, sorvetes, sucos, refrescos, picolés, licores, vinhos e xaropes (SOUZA, 2001). O fruto é uma baga globosa ou oblonga (mais longa que larga) com epicarpo (casca) membranáceo de coloração verde amarelado ou verde rosado e até manchas ou estrias avermelhadas de 4 a 6 cm de comprimento por 3 a 5 cm de largura, pesando de 25 a 120 gramas. A mangaba possui um elevado teor de ácido ascórbico, o que a coloca entre as frutas consideradas ricas em vitamina C. Estudos realizados na Embrapa Agroindústria Tropical mostraram que a polpa da mangaba possui teor de vitamina C de cerca de 139 mg/100 g (MOURA et al., 2002). A polpa da mangaba também é rica em ferro, manganês e zinco. O ferro em associação com a vitamina C torna-se importante na composição da fruta. A vitamina C aumenta a biodisponibilidade de ferro, aumentando a absorção pelo organismo. Os compostos fenólicos polimerizados como os taninos, também estão presentes e em quantidades elevadas. Esses compostos estão associados à prevenção de doenças crônico-degenerativas (AGUIAR FILHO et al., 1999).

Atualmente o Sergipe é o maior estado brasileiro produtor da fruta. Na maioria dos estados produtores, a produção de frutos que chega ao mercado e às indústrias de processamento é principalmente extrativista. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2013), a produção de mangaba no Brasil decaiu entre os anos de 2004 (999 toneladas) a 2010 (722 toneladas).

Além do fruto, outras partes da planta possuem potencial farmacológico. Por exemplo, as folhas são utilizadas para extração de substâncias (esteróides, triterpenos e taninos) usadas para controle da pressão arterial. Em um estudo realizado em camundongos, foi comprovado que essas substâncias são 10 vezes mais eficientes que captopril, medicamento comumente usado para controle da pressão arterial (SILVA et al., 2011). Além de inibir a produção de substâncias que causam a hipertensão, o chá da folha de mangabeira tem ação vasodilatadora por meio da produção de óxido nítrico (FERREIRA et al., 2011).

A casca também apresenta potencial farmacológico, sendo possível extrair desta, diferentes tipos de flavonóides, antocianinas e taninos que são utilizados no tratamento de doenças estomacais, obstrução do fígado e do baço, icterícias, afecções hepáticas, moléstias crônicas e cutâneas (VIEIRA-NETO, 1997). Moraes et al. (2008) avaliaram a ação anti bacteriana e o efeito gastroprotetor do extrato da casca do caule da mangabeira em camundongos. Os resultados demonstraram que este extrato possui efetividade no combate e cicatrização de úlceras gástricas por sua capacidade de estimular a síntese de muco e produzir

efeito antissecretório. Os autores observaram também efeito anti-*Helicobacter pylori* e ausência de toxicidade.

O látex foi muito utilizado durante a Segunda Guerra Mundial para produção de borracha, hoje em dia o látex de mangabeira é utilizado na medicina caseira no tratamento de diversas doenças (PINHEIRO et al., 2001). Todas as partes da planta, inclusive raízes, produzem o látex. Um trabalho realizado por Pinheiro (2003) mostra que poucos estudos foram realizados sobre as características do látex e sua produção na mangabeira. A mangabeira possui o sistema laticífero de vasos inarticulados. Cada incisão no tronco, em termos médios, é capaz de esgotar uma área bem limitada de apenas 13 cm acima e 5cm abaixo da superfície do corte. Como o sistema de vasos é restrito, exige tempo para recompor o látex e permitir outra sangria (PINHEIRO et al., 2001).

Quanto ao rendimento da mangabeira, Bekkedahl e Saffioti (1998) afirmam que mangabeiras adultas, corretamente sangradas, em uma ou duas horas de escorrimento, produzem um litro de látex por sangria, produção equivalente a da seringueira. Mas, enquanto a mangabeira é sangrada no máximo três vezes no ano, a seringueira é sangrada em média 60 vezes no ano.

Na medicina popular o látex vem sendo empregado no tratamento de doenças fúngicas, tuberculose, disfunções hepáticas, úlceras, dermatoses, verrugas, câimbras, pancadas e infecções (SILVA JUNIOR, 2003; PINHEIRO et al., 2001; GUARIM NETO, 1997).

Além do uso na medicina popular, recentes trabalhos científicos vêm mostrando o potencial farmacológico do látex de mangaba. Por exemplo, Marinho et al (2011), mostraram que o látex de mangabeira apresenta atividade anti-inflamatória, o estudo foi realizado em ratos, por meio do qual foi constatada a inibição da formação de ácido nítrico, PGE2 e produção de citocinina. Outro trabalho realizado em coelhos, foi descrito por Santos et al. (2007) e revelou o potencial antimicrobiano do látex da mangabeira frente a diferentes microorganismos. Outra propriedade terapêutica do látex foi descrita por Sampaio (2008), que realizou testes bioquímicos em ratos e determinou a atividade antioxidante do látex, a qual gerou efeito hepatoprotetor significativo.

Tendo em vista o grande potencial terapêutico do látex de *H. speciosa*, verificado em diversos estudos, nota-se a necessidade de realização testes de biocompatibilidade *in vitro* de acordo com as normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA-ISO 10993). Estes métodos de biocompatibilidade incluem testes de citotoxicidade e genotoxicidade que se destinam a determinar a resposta biológica de célula utilizando parâmetros biológicos apropriados, assegurando assim o uso de biomateirais na área da saúde.

1.5 Citotoxicidade

Citotoxicidade é um termo abrangente que significa, em linhas gerais, morte celular induzida (TEIXEIRA et al., 2003). A citotoxicidade se traduz pela desorganização celular, bem como pelo aspecto granuloso e arredondado das células, e consequente aparecimento de alterações morfológicas quando as células são expostas a agentes externos (STREISSLE et al., 1981).

O teste de citotoxicidade tem como objetivo detectar o potencial de um material em produzir efeitos letais ou subletais em sistemas biológicos em nível celular. Este teste deve ser aplicado a todas as categorias de biomateriais e buscam resguardar a segurança relativa ao uso de drogas vegetais, podendo resultar em dados para sustentação deste uso (BORGIO et al., 2004). Entre essas análises o teste de *Allium cepa* (cebola) vem recebendo destaque (DEMIRCI et al., 2008).

1.6 Genotoxicidade

Genotoxicidade é a propriedade de um agente químico, físico ou biológico de causar alterações no DNA que podem ou não ser reparáveis (ROSSI et al., 2003). A genotoxicidade ocorre quando a capacidade de replicação e de levar informação do DNA é alterada. Os danos ao DNA podem resultar em efeitos mutagênicos e carcinogênicos (FERREIRA et al., 2009).

Os principais tipos de genotoxicidade ocorrem por danos no DNA, mutações pontuais, aberrações cromossômicas e surgimento de micronúcleos (DIANA et al., 2000). Micronúcleos são pequenos corpos contendo ácidos desoxirribonucleicos (DNA), localizados no citoplasma, resultantes de quebras cromossômicas, formando fragmentos acêntricos, ou com sequência de cromossomos inteiros que não se prendem ao fuso mitótico e dessa forma, não chegam aos pólos das células durante a mitose ou a meiose (MILLER, 1973).

Estudos de genotoxicidade e mutagenicidade são necessários por contribuírem com a utilização segura e eficaz de novas drogas ou de novos tratamentos, devendo ser realizados nos estágios iniciais do desenvolvimento de novos produtos, a fim de diagnosticar uma potencial atividade genotóxica e/ou carcinogênica e para auxiliar na obtenção de novas estruturas químicas menos tóxicas (GREEN, 2001).

A avaliação do potencial genotóxico de substâncias pode ser realizada utilizando diferentes organismos procariotos ou eucariotos, analisando alterações gênicas, quebras simples e duplas no DNA e alterações cromossômicas (GRANT, 1994).

O sistema *Allium cepa* é um teste *in vivo*, o qual vem sendo bem aceito para o estudo de efeitos de citotoxicidade e genotoxicidade de plantas medicinais. Neste teste as raízes da cebola ficam em contato direto com a substância testada, permitindo a avaliação de

concentrações diferentes do material a ser testado, além de permitir testar diversos materiais ao mesmo tempo (VICENTINI et al., 2001).

1.7 Avaliação da biocompatibilidade de uma substância: teste *Allium cepa*

O teste *Allium cepa* permite avaliar o efeito citotóxico e genotóxico da substância testada sobre a célula. As razões para a utilização de sistemas vegetais são muitas: as plantas são fáceis de armazenar e manipular e são de baixo custo (DIANA et al., 2000).

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais (CABRERA & RODRIGUEZ, 1999). O teste de *Allium cepa* foi utilizado para detecção de genotoxicidade pela primeira vez por Levan (1938) e em 1985, Fiskesjö realizou as primeiras adaptações do teste para a utilização no monitoramento ambiental, além da avaliação de compostos solúveis e insolúveis em água até avaliação de efeitos de misturas complexas (RODRIGUEZ et al., 1999).

O teste consiste basicamente em colocar o *Allium cepa* em um recipiente com água deixando as raízes do bulbo se desenvolver em mais ou menos 3 dias. Após esse período os tratamentos são colocados e deixados por 72h, às pontas das raízes são cortadas, posteriormente são preparadas as lâminas e as mesmas avaliadas por meio de microscópio ótico, aonde serão analisadas as alterações cromossômicas (TEIXEIRA et al., 2003).

Como mencionado anteriormente um material biocompatível além de não ser citotóxico e genotóxico, tem que apresentar alguma biofuncionalidade. Entre as funcionalidades apresentadas por determinada substância destaca-se a angiogênese, que é o processo pelo qual novos vasos sanguíneos são desenvolvidos a partir de vasos pré-existentes. Para a avaliação da angiogênese de uma substância um teste que vêm recebendo destaque é o teste da membrana corioalantóide (MCA), principalmente por sua rapidez e simplicidade.

1.8 Avaliação da biofuncionalidade de uma substância: teste (MCA)

A membrana corioalantóica (MCA) embrionária de galinha é uma membrana extraembrionária formada por uma fusão da mesoderme com a ecdoderme coriônica (Figura 4), que se encontra abaixo da membrana da casca, a partir quarto dia do desenvolvimento embrionário (HAMILTON, 1965).

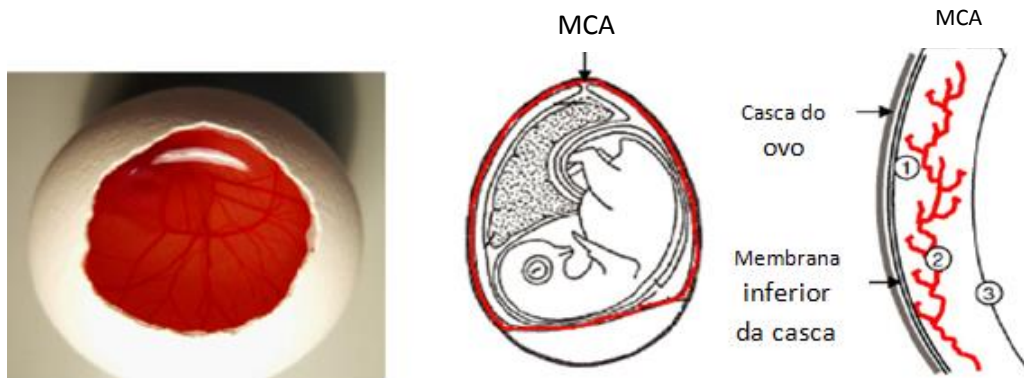


Figura 4: Esquema da membrana corioalantóide embrionária presente em ovos de galinha (VARGAS et al., 2007).

O ensaio MCA foi desenvolvido no início dos anos 70 e adaptado por Folkmann et al, 1987. Ao longo dos anos essa técnica vem sofrendo alterações, mas o princípio básico é adicionar à membrana corioalantóide do ovo de galinha fertilizado, um papel embebido com substância a qual deseja testar, através de um pequeno orifício realizado na casca do ovo. Após 1 a 3 dias de contato da substância com embrião pode se avaliar a capacidade angiogênica, antiangiogênica e teratogênica a substância em estudo (ILLANES et al., 1999; QUIEGLEY e ARMSTRONG, 1998; MOSTAFA et al., 1980). Esse método de estudo é rápido, tecnicamente fácil, barato e os resultados têm grande aceitabilidade no meio científico (RIBATTI et al., 2001).

A principal desvantagem do ensaio da MCA é que a membrana já contém uma rede vascular bem desenvolvida e sofre mudanças rápidas tanto em sua morfologia quanto na velocidade da proliferação de células endoteliais durante o desenvolvimento embrionário (BORGES et al., 2003). Além disso, os ensaios são executados em aves, podendo limitar o aproveitamento integral desses resultados em mamíferos. No entanto, o modelo é considerado válido pela literatura contemporânea para testes acerca da atividade angiogênica de diversas substâncias como esteróides, heparina, anti-cancerígenos e antagonistas de moléculas de adesão, sendo crescentes os trabalhos publicados nessa área (KATRANCIOGLU et al., 2012).

2 OBJETIVOS:

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial do látex de mangabeira como biomaterial. Para isso serão utilizados testes que avaliem sua biocompatibilidade e funcionalidade em sistemas vivos.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o potencial citotóxico e genotóxico do látex de *Hancornia speciosa*, por meio do teste de *Allium cepa*.
- Detectar atividade angiogênica do látex de *Hancornia speciosa*, utilizando como modelo experimental a membrana corioalantóide (CAM) de ovo fertilizado de galinha;
- Avaliar a formação de novos vasos sanguíneos, presença de inflamação e hiperemia a partir de análise histológica das membranas CAM submetidas ao tratamento com látex de mangabeira.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material botânico

As coletas de látex foram realizadas na Estação Experimental da Universidade Estadual de Goiás, Unidade Universitária de Ipameri-GO, 17°43'51"S, 48°09'17"W. De acordo com Monachino (1945), a linhagem utilizada foi classificada como *Hancornia speciosa* Gomes, identificada por Prof. MS. Ismael Martins Pereira. Um exemplar da planta foi depositado no herbário da Universidade Estadual de Goiás, sob o número 4875 (Figura 5).



Figura 5: Exsicata *Hancornia speciosa* Gomes, identificada pelo Prof. MS. Ismael Martins Pereira. Depositada no herbário da UEG sob o número 4875.

O látex foi coletado por meio de perfuração no tronco da árvore usando um recipiente estéril. A incisão da casca foi realizada utilizando uma faca e o corte tem aproximadamente 10 cm de comprimento e 0,5 cm de profundidade. Após a coleta, o látex foi centrifugado para retirada de impurezas.

3.2 Avaliação da biocompatibilidade

Para avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade foi utilizado o teste de *Allium cepa*, a metodologia utilizada foi descrita por Sampaio, 2012. Cujas etapas estão descritas a seguir:

3.2.1. Obtenção de *Allium cepa*

Para a execução do teste foram utilizadas *Allium cepa* (cebolas) de tamanho médio e uniforme com catáfilos externos brancos, mesma origem, não germinados e saudáveis, adquiridas comercialmente e mantidas em local livre de umidade e ao abrigo da luz.

3.2.2. Grupos experimentais

Os grupos experimentais foram compostos de cinco diferentes tratamentos: 1. solução de látex a 10%; 2. solução de látex a 5%; 3. solução de látex a 1% diluídos em água; 4. controle negativo (água destilada); 5. controle positivo (azida sódica, 2 g/L).

3.2.3 Procedimentos

Foram distribuídos 15 bulbos para cada concentração a ser testada, tendo-se o cuidado de retirar, com auxílio de bisturi, as raízes secas e camadas externas secas ou com mofo, atentando-se para que a área radicular não fosse danificada. Em seguida, o parênquima central da coroa de brotamento foi retirado para aumentar a absorção das soluções, a uniformidade de brotamento e o crescimento das raízes.

Os bulbos foram lavados em água corrente, por cerca de 20 minutos. Os bulbos descascados foram colocados em água à temperatura ambiente, durante o procedimento de limpeza a fim de reduzir os efeitos de possíveis inibidores do brotamento. Os bulbos destes grupos foram colocados em recipientes de vidro, previamente esterilizados, com capacidade de 50 mL, com a área radicular mantida diretamente em contato com a água.

Após três dias de exposição à água, os bulbos foram colocados em contato com as soluções testes. As raízes foram cultivadas em cada tratamento por 72 h e em seguida as pontas dessas raízes foram cortadas e então utilizadas para análise citogenética. As raízes foram fixadas em solução de Carnoy (etanol 99%; ácido acético glacial - 3:1) por 24 h, e refrigeradas até o momento da preparação das lâminas. O teste foi conduzido em temperatura controlada, sobre bancada sem vibrações e sem iluminação direta.

3.2.4 Preparo das lâminas

Para o preparo das lâminas, foram utilizadas de 2 a 3 raízes de cada bulbo, sendo que foram utilizados somente 5 bulbos de cada tratamento para as análises. As raízes foram lavadas em água para a retirada do fixador do material e a seguir hidrolisadas em uma solução de HCl 5M por 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foi realizada a retirada da coifa, as raízes foram dissecadas com uma gota de ácido acético 45% e esmagadas com uma lamínula. As lamínulas foram retiradas após congelamento em nitrogênio líquido e as lâminas

coradas de 5 a 10 minutos, com corante Giemsa 5%. Em seguida as lâminas foram submetidas à análise em microscópio ótico.

3.2.5 Análises das lâminas

As lâminas foram avaliadas utilizando microscópio ótico com até 100 vezes de aumento. No total foram analisadas 1.000 células por bulbo, em um total de 5 bulbos por tratamento. Foi avaliado o potencial citotóxico pelo índice mitótico (IM), e o potencial genotóxico pela frequência de anomalias do ciclo mitótico (ACM) e a incidência de micronúcleos (M).

O IM foi calculado para cada tratamento utilizando o número de células em divisão/1000 células. E para a taxa de divisão celular utilizou-se o índice mitótico (IM) por 1000 (SETH et al., 2008).

3.2.6 Análise estatística

Foram obtidos os valores do índice mitótico (IM), a frequência de anomalias do ciclo mitótico (ACM) e a incidência de micronúcleos. Os grupos foram divididos em cinco tratamentos, cada um contendo cinco bulbos, sendo que os valores foram analisados por meio da Análise de Variância (ANOVA) por meio da qual é determinado se há diferença significativa entre as médias e comparados teste de Tukey (SISVAR, 2010). Sendo consideradas significativas as diferenças que apresentaram valor $p < 0,05$.

3.3 Avaliação da biofuncionalidade

Para avaliação do potencial angiogênico, ou seja, da biofuncionalidade do látex de mangabeira foi realizado o teste da membrana corioalantóide (CAM) em ovos de galinha fertilizados, a metodologia realizada foi segundo Parente et al, 2011. A seguir são descritas as etapas:

3.3.1 Obtenção dos ovos fertilizados

Foram utilizados 100 ovos de galinha férteis (*Gallus gallus domesticus*) provenientes da Fazenda Boa Vista, no município de Campo Alegre de Goiás. Foram formados cinco grupos experimentais, sendo que cada grupo foi composto por 20 ovos fertilizados.

3.3.2 Substâncias utilizadas

Os ovos foram submetidos a diferentes substâncias: água esterilizada (MilliQ), solução de dexametasona 4mg/ml (C22H29FO5 da Aché Laboratórios Farmaceuticos, SA – Lote n°1204279), Regederm® – pomada de látex de seringueira (Pele Nova Biotecnologia), Látex de mangabeira diluído em água e diluído em amônia (anticoagulante).

3.3.3 Experimento

A metodologia do ensaio CAM foi realizada de acordo com Melo-Reis (2010). Os ovos foram incubados a 37 °C, em uma câmara umidificada (60-70% de umidade relativa) e divididos em cinco grupos de 20 ovos de galinha fertilizados. No quinto dia de incubação foi realizado um orifício circular na extremidade a qual se localiza a câmara de ar do ovo e a seguir a membrana interna foi removida e o ovo teve seu orifício lacrado com filme. A seguir os ovos foram devolvidos à incubadora.

No décimo terceiro dia de incubação, os ovos foram submetidos aos tratamentos: 1) látex mangabeira com 0,01% amônia (anticoagulante); 2) látex mangabeira diluído em água na proporção 1:1; 3) Regederm®, composto a base de látex de seringueira (controle positivo); 4) água destilada (controle negativo); 5) solução de dexametasona (inibidor). Essas substâncias foram colocadas em discos de papel de filtro e posteriormente colocadas em cima da CAM em condições de esterilidade. A resposta angiogênica foi avaliada 72 horas após os tratamentos. As CAMs foram fixadas em solução de formaldeído (3,7%) durante 5 minutos. A seguir, a CAM foi recortada com tesouras cegas curvas e mantidas em placas de Petri na presença de uma solução de formaldeído.

3.3.4 Obtenção e análise das imagens

Através de uma câmera digital foram tiradas fotos da CAM em um fundo branco. A análise e quantificação da rede vascular neoformada foram realizadas por meio das imagens capturadas. A área percentual de cada ensaio foi determinada utilizando os programas para Windows (versão 2.0.5) Gimp e Imagem J (versão 1.28). As imagens foram preparadas de forma que a saturação de luz e o contraste permitissem uma melhor resolução dos vasos sanguíneos.

3.3.5 Análises estatísticas

Com objetivo de analisar o potencial angiogênico do látex de *Hancornia speciosa*, a porcentagem da área de CAM entre grupos controles e tratados foram calculados por meio da Análise de Variância (ANOVA) e comparados teste de Tukey (SISVAR, 2010). Sendo consideradas diferenças significantes as que apresentaram valor $p < 0,05$.

3.3.6 Análises histológicas

A análise histológica das membranas foi realizada na Universidade Federal de Goiás, no Departamento de Patologia Tropical, sob a supervisão do Professor Dr. Ruy Lino de Souza Júnior. A metodologia utilizada na confecção das lâminas foi a emblocagem das membranas corioalantóides (CAM) em parafina. Os blocos de parafina foram cortados e os fragmentos foram corados com hematoxilina-eosina (HE). A formação de vasos foi avaliada ao microscópio óptico de luz e posteriormente fotografada utilizando uma câmara digital acoplada ao microscópio.

As seguintes características morfológicas da CAM foram utilizadas como parâmetros nessa comparação: 1. ocorrência de hiperemia, 2. presença de elementos inflamatórios e 3. formação de novos vasos. Os diferentes parâmetros foram analisados e os resultados visualmente classificados de acordo com a intensidade em: ausente (0), discreto (1), moderado (2) e acentuado (3). A análise estatística do teste histológico foi realizada através de teste não paramétrico, chamado Kruskal Wallis, sendo considerado significativos $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da biocompatibilidade

4.1.1 Teste de Citotoxicidade e Genotoxicidade

Nessa pesquisa foram avaliados a genotoxicidade e citotoxicidade do látex através de teste *in vivo* utilizando o sistema *Allium cepa*. Os parâmetros considerados foram os seguintes: 1.) índice mitótico (IM) para avaliação da citotoxicidade e 2) presença de micronúcleo (M) e anomalias na divisão celular (ACM) para a análise da genotoxicidade.

Os níveis de citotoxicidade de um agente podem ser determinados pelo aumento ou diminuição do IM. O índice mitótico (IM) mede a proporção das células na fase M do ciclo celular e a sua inibição pode ser interpretada como a morte celular ou um atraso na cinética de proliferação de células (PANDA et al., 2005). Na avaliação da citotoxicidade foi observada uma diferença significativa nos diferentes tratamentos (Tabela 1). Pode-se observar um aumento do índice mitótico quando comparado o látex de mangabeira com o controle positivo (azida sódica) e uma redução quando comparado com o controle negativo (água). A análise estatística desses resultados, realizadas a partir da comparação das médias pelo teste Tukey, mostrou que existe diferença significativa entre o grupo tratado com látex e os controles positivo e negativo.

Tabela 1. Análise das lâminas do teste de *Allium cepa*, quanto à citotoxicidade e genotoxicidade.

Tratamentos	Citotoxicidade	Genotoxicidade	
	Índice Mitótico	Anomalias	Micronúcleos
Látex 1%	55,13* a	2 a	0 a
Látex 5%	36,17* b	1 a	0 a
Látex 10%	38,65* b	4 a	2 a
Água	66,78* c	1 a	1 a
Ázida sódica	11,82 d	255* b	100* b

* $p < 0,05$: Médias seguidas de mesma letra não se diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey.

** Letras iguais representam tratamentos onde não houve diferença significativa.

Panda et al. (2005) descrevem que para uma substância ser considerada citotóxica ela deve causar um decréscimo no IM superior a 50 %, sendo esse o chamado limite citotóxico. A queda do índice mitótico obtida nos tratamentos com o látex de mangabeira foi inferior a 50% em comparação com o controle negativo, não apresentando assim um impacto letal sobre o organismo, apesar a taxa de diminuir a divisão celular. Assim, provavelmente o látex de mangabeira apresenta compostos químicos que tenham efeito inibitório no ciclo celular. Esse efeito inibitório é maior quanto maior a concentração do látex de mangabeira. Embora as

diferentes concentrações testadas (1, 5 e 10%) não resultaram em atividade citotóxica. Resultados semelhantes foram descritos para extratos de outras plantas, tais como *Alpinia nutans* K. Schum e *Pogostenum heyneanus* Benth. (FACHINETTO et al., 2007). Sudhakar et al. (2001) considera que essa redução na atividade mitótica ocorre devido à inibição da síntese de DNA ou de um bloqueio na fase G2 do ciclo celular, atrasando assim o ciclo celular.

A genotoxicidade é caracterizada pela presença de aberrações na divisão celular e micronúcleos. Os resultados obtidos nesse trabalho estão mostrados na Tabela 1 e Figura 6. As análises mostraram a presença de poucas anomalias e micronúcleos nas células submetidas ao tratamento com látex em diferentes concentrações. O látex na concentração de 10% (n=4) apresentou uma frequência maior de anomalias, mas em comparação com o controle positivo (n= 255) esse índice foi muito baixo. Entre os diferentes tipos de anomalias observadas as mais comuns foram atrasos no fuso mitótico (Figura 5: 1b; 3b e 5b). Foi observada também a presença de micronúcleos nas diferentes concentrações do látex de mangabeira testadas, mas não foram significativos quando comparados com o controle positivo. No controle positivo (Figura 5b) pode-se observar alta frequência de micronúcleos (n=100). As análises estatísticas mostram que não existem diferenças significativas entre os tratamentos com o látex de mangabeira e o controle negativo. Por outro lado, obteve-se uma diferença altamente significativa quando comparado os tratamentos a base de látex com o controle positivo. Esses resultados evidenciam estatisticamente que o látex de mangabeira não tem potencial genotóxico, nas concentrações testadas.

Em relação as anormalidades cromossômicas, a mais frequentemente observada foi a formação de pontes cromossômicas, durante anáfase e telófase (Figura 5). As pontes observadas nas células foram, provavelmente, formadas por quebra e fusão das cromátides. De acordo com Kabarity et al. (2008) pontes cromossômicas podem ser causadas pela viscosidade de cromossomos e por isso na divisão permanecem ligados por pontes resultando assim em algum tipo de anomalia. Além das pontes cromossômicas, outro tipo de aberração observada foi a presença de micronúcleos, principalmente na fase da interfase. Os micronúcleos resultam de fragmentos acêntricos ou atraso em cromossomos que não conseguem incorporar os núcleos das células durante a telófase, podendo causar a morte celular devido à supressão de genes primários (MENG et al., 2003). Assim, os resultados deste estudo sugerem que o látex de mangabeira, o qual já vem sendo utilizado na medicina caseira, não possui efeito citotóxico e genotóxico, não causando danos nas células quando utilizado de forma adequada.

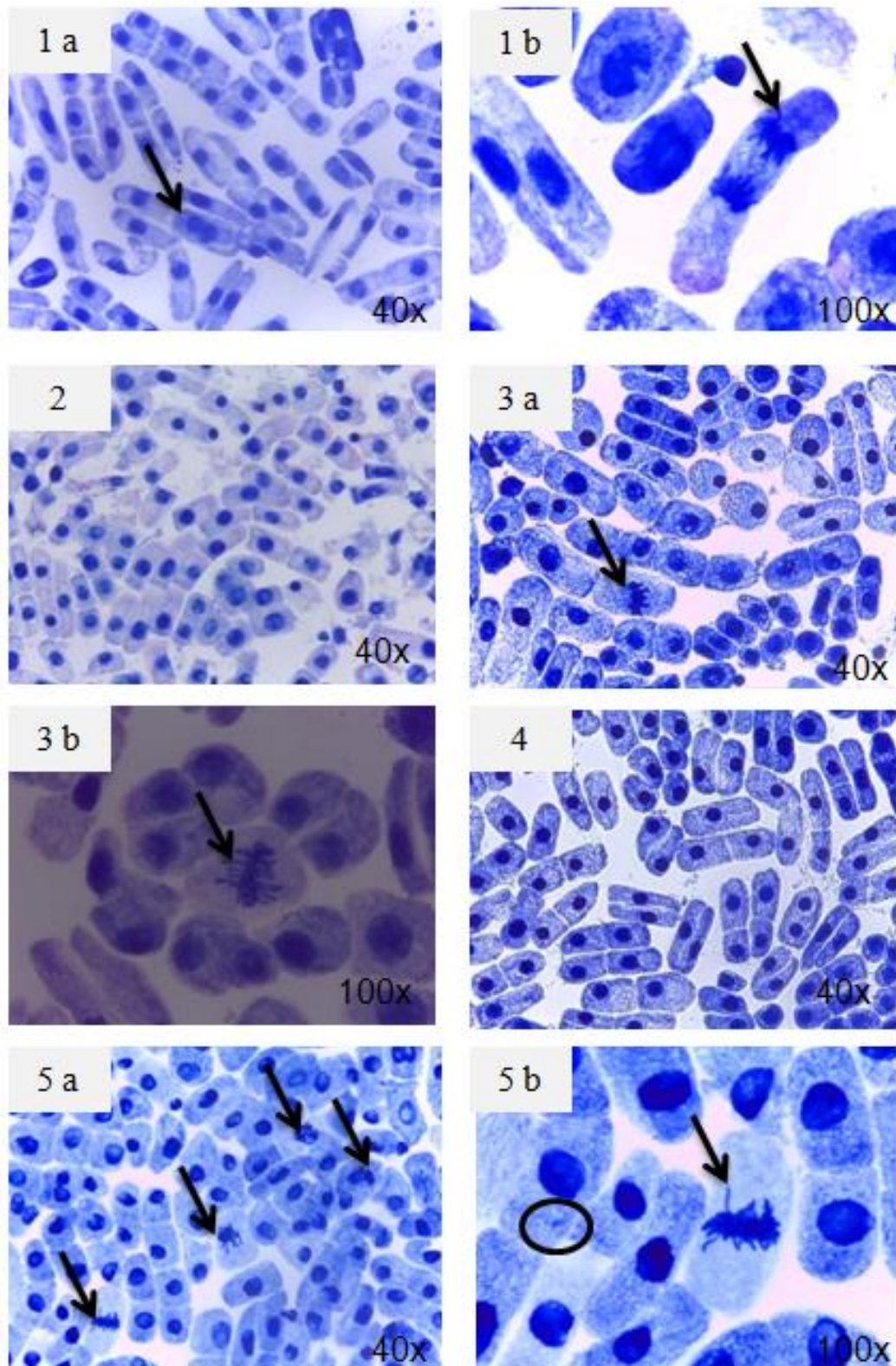


Figura 6: Fotografias das células de cebola submetidas aos diferentes tratamentos: 1a e b. Látex de mangabeira a 1% observa-se atraso nos cromossomos; 2: Látex de mangabeira à 5%, não observa-se a formação de anormalidades; 3a e b: Látex de mangabeira 10%, em destaque a formação de anormalidades; 4: Água (controle negativo) não observa-se a formação de anormalidades; 5a e b: Ázida sódica (controle positivo). Setas indicam anormalidades no ciclo celular e círculo a presença de micronúcleos. 40X refere-se ao aumento de 40 vezes e 100X ao aumento de 100 vezes.

4.2 Avaliação da biofuncionalidade

Os resultados obtidos a partir da rede vascular neoformada foram analisados por meio de dois processos diferentes: 1.) digitalização da imagem da CAM e quantificação da rede vascular; e 2.) análise histológica do vasos neoformados.

4.2.1 Obtenção das imagens da CAM e quantificação da angiogênese

As imagens da membrana corioalantóide de ovos de galinha fertilizados tratadas com látex de mangabeira e tratamentos controles são mostrados na Figura 7. A análise visual dos resultados apresentados nessas imagens permite observar uma nítida diferença na formação da rede vascular entre o grupo tratado com látex e os diferentes grupos controles. As maiores vascularizações foram observadas nos grupos tratados com látex de mangabeira (1 e 2) e controle positivo (4), enquanto que as menores porcentagens de vascularização foram observadas no controle negativo (5) e inibidor (6).

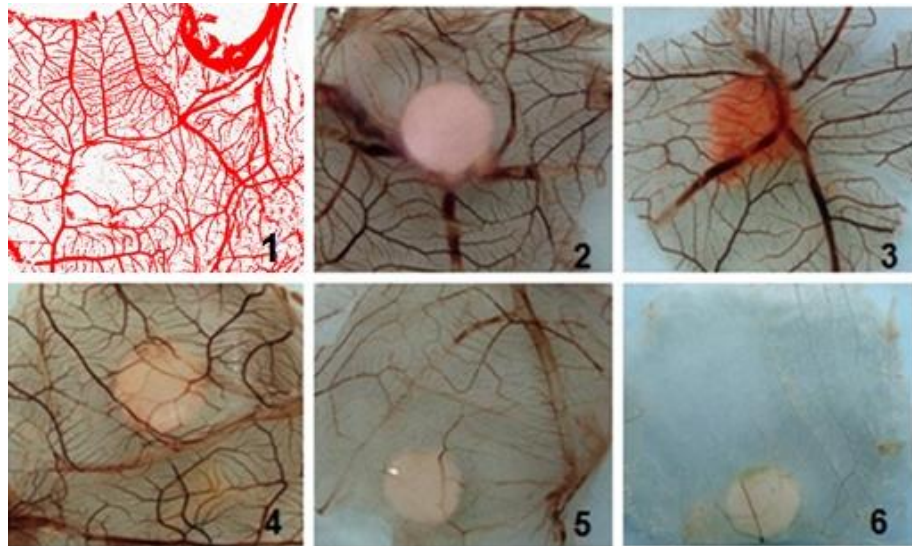


Figura 7: Imagens da CAM e seus respectivos tratamentos: 1) esquema de análise de imagem obtida com o Programa *Imagem J*; 2) látex com amônia 0,01%; 3) látex com água 1:1; 4) Regederm® (controle positivo); 5) água (controle negativo); 6) dexametasona (inibidor).

Para confirmar as análises visuais, as imagens foram submetidas ao programa *Image J*. A quantificação da área vascularizada comprovou que nos tratamentos à base de látex de *H. speciosa* e Regederm® a porcentagem de vascularização foi maior que nos grupos controle negativo e inibidor. A Tabela 2 e Figura 8 apresentam as médias de vascularização, desvios padrões e respectivas análises estatísticas das CAMs submetidas aos cinco diferentes tratamentos.

Tabela 2: Porcentagem de vascularização obtida com látex de mangabeira e diferentes controles, $p < 0,05^*$.

Tratamentos	Teste Membrana Corioalantóide		Teste de comparação de médias (Tukey)
	Porcentagem de vascularização	Médias de vascularização \pm SD	
Látex amônia	19,5; 19,8; 19,2; 22,1; 19,9; 18,9; 21,7; 19,3; 20,7; 22,3; 19,5; 19,2; 19,5; 20,4; 20,3; 23,3; 19,0; 18,5; 20,0.	20,27* \pm 1,32	A
Látex água	21,4; 22,6; 21,1; 19,7; 20,2; 20,3; 19,0; 21,2; 24,3; 19,4; 23,0; 23,4; 19,6; 19,8; 20,0; 23,0; 23,8; 20,0; 21,0.	21,23* \pm 1,58	A
Regederm® (controle positivo)	19,1; 10,1; 20,7; 19,7; 22,0; 21,7; 19,0; 19,0; 20,0; 19,4; 18,0; 21,3; 20,1; 20,2; 19,7; 19,8; 21,4; 22,4; 26,7; 25,8.	20,39* \pm 3,12	A
Água (controle negativo)	8,0; 11,9; 13,2; 12,2; 11,3; 10,3; 9,8; 11,8; 8,6; 9,1; 10,0; 5,2; 5,5; 6,9; 9,8; 7,6; 9,5; 5,7; 8,2; 9,0.	9,18 \pm 2,21	B
Dexametasona (inibidor)	5,6; 4,14; 5,2; 9,7; 13,8; 9,2; 8,4; 4,7; 7,9; 6,7; 5,4; 5,4; 7,2; 7,3; 5,0; 4,0; 7,5; 6,2; 5,6.	6,66 \pm 2,31	C

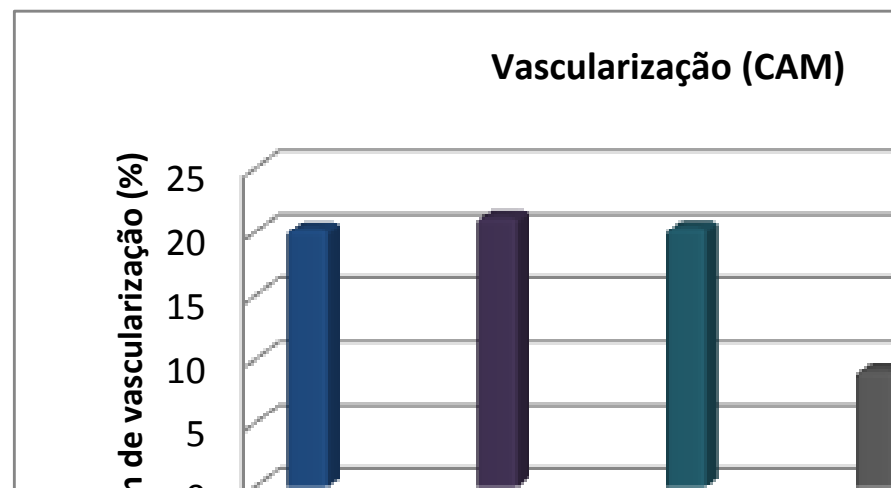


Figura 8: Gráfico apresentando a comparação entre as médias de vascularização dos tratamentos a base de látex com os controles positivo, negativo e inibidor.

Os testes estatísticos realizados para a comparação das médias de vascularização mostraram que os três grupos submetidos ao tratamento com látex não diferem estatisticamente entre si. Por outro lado, as médias de vascularização dos grupos tratados com látex diferem significativamente do controle negativo ($P < 0,05$) e do inibidor ($P < 0,05$). Ainda, o inibidor mostrou uma redução considerável em relação ao controle negativo ($P < 0,05$). Isso permite sugerir que o látex de mangabeira tem o mesmo potencial angiogênico do látex de seringueira, o qual é atualmente considerado padrão ouro da ANVISA e o qual tem sido comercializado sob a fórmula do Regederm® pela empresa PeleNova. Esse resultado é promissor, uma vez que existe uma procura por novos compostos bioativos com potencial

angiogênico devido à ocorrência de alergias relacionadas ao uso de produtos à base de látex de seringueira (CABAÑES et al., 2012).

O ensaio CAM tem sido amplamente utilizado como um modelo *in vivo* para estudar a atividade angiogênica de várias substâncias, tais como: fatores de crescimento, citocinas, hormônios, drogas, extratos de tecidos, biomateriais, enxertos de tecido implantados (ZWADLO-KLARWASSER et al., 2001). Dentre essas diferentes substâncias testadas encontra-se o látex de diferentes plantas. Ferreira et al. (2009) testou o potencial angiogênico das frações borracha e soro látex de *Hevea brasiliensis* a partir do teste CAM e como resultado observou que o teste é extremamente sensível e capaz de determinar que a fração responsável pela atividade angiogênica é a fração soro. Outro estudo o qual mostra a eficiência do teste CAM para quantificação da atividade angiogênica foi realizado por Melo-Reis et al. (2010). Os autores comprovaram a eficiência do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. em promover a vascularização em ovos de galinhas fertilizados. Assim como os resultados apresentados na presente pesquisa, os resultados obtidos com *S. umbellatum* são similares aos obtidos em *Hevea brasiliensis* (MELO-REIS et al., 2010).

Desde o século XV, já se é conhecido que a dose correta é que diferencia um veneno de um remédio. Assim, outro ponto importante a ser discutido é a concentração dos compostos ativos presentes no látex. Algumas lactíferas possuem uma concentração alta de compostos nocivos à vida e causam um efeito indesejável sobre os sistemas vivos. Por exemplo, o látex de *Synadenium umbellatum* quando utilizado no teste CAM sem diluição causou a morte dos embriões durante o teste CAM (MELO-REIS et al., 2010). Dessa forma, o potencial angiogênico do látex de *Synadenium umbellatum* só foi observado com diluições de 10 e 20 mg/ml. Diferente desse resultado, os látex de *Hevea brasiliensis* e *Hancornia speciosa* não são tóxicos *in natura* e não precisam ser diluídos para a sua utilização em sistemas vivos. As análises dos resultados do presente trabalho mostraram que não existem diferenças significativas nas porcentagens de vascularização das CAMs quando se utilizaram o látex amonizado 0,01% e látex diluído em água. Isso sugere que o látex de *Hancornia speciosa* não é tóxico a sistemas vivos e não precisa ser diluído antes do seu uso.

A utilização da amônia durante a coleta do látex é outro ponto que deve ser discutido. A amônia é um componente comumente empregado na manipulação de látex como um eficiente bactericida e anticoagulante. Muitas indústrias pneumáticas utilizam esse componente na manufatura de produtos tais como: brinquedos, bexigas, cateteres, luvas, preservativos e outros (KEKWICH et al., 1996). Contudo, existe uma discussão sobre o efeito da adição da amônia na incidência de alergias associadas a produtos que utilizam borracha como matéria-prima. Em um trabalho com pessoas alérgicas a látex de seringueira

La Gruta et al. (2003) foi constatado que o grupo exposto ao látex amonizado apresentou menor resposta alergênica do que o grupo exposto ao látex não amonizado. A explicação dos autores foi a de que a presença da amônia destruiria algumas das proteínas alergênicas presentes no látex. Por outro lado, Floriano et al. (2013), mostraram que a adição de amônia aumenta a citotoxicidade e genotoxicidade do látex de seringueira em testes *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que a alergia a produtos à base de borracha pode ser devido a adição da amônia. Os resultados referentes à avaliação da angiogênese realizados nessa pesquisa não mostraram diferenças significativas nas porcentagens de vascularização entre o látex amonizado e não amonizado, contudo as análises histológicas da CAM mostraram diferenças entre esses dois tratamentos.

4.2.2 Análise histológica das CAMs

Após a análise de imagem as CAMs submetidas aos diferentes tratamentos foram analisadas histologicamente. A figura 9 apresenta em detalhes os três parâmetros avaliados nesse trabalho: neovascularização ou formação de novos vasos sanguíneos (Figura 9A); presença de elementos inflamatórios (Figura 9B) e hiperemia (Figura 9C).

É importante destacar que os processos de angiogênese, a inflamação e a hiperemia são eventos correlacionados. Células inflamatórias são importantes para ativar fatores, tais como as citocinas, interleucinas, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de ativação de plaquetas. Estes são fatores endoteliais específicos de células de crescimento e apresentam um papel importante na iniciação e amplificação da resposta inflamatória (ZIJLSTRA et al., 2006) e, conseqüentemente, na ativação de fatores angiogênicos (MAY et al., 2008; DONÀ et al., 2003), uma vez que todas elas induzem o crescimento de vasos pré-existent e neoformação de outros vasos na CAM. Além da presença de elementos inflamatórios, outro parâmetro que se deve ser considerado na análise histológica é a presença de hiperemia. De acordo com Mitchell (2005), a hiperemia geralmente expressa um aumento da quantidade de sangue circulante em um determinado local, ocasionado pelo aumento do número de vasos sanguíneos funcionais, o que facilita a ocorrência de angiogênese e presença de elementos inflamatórios.

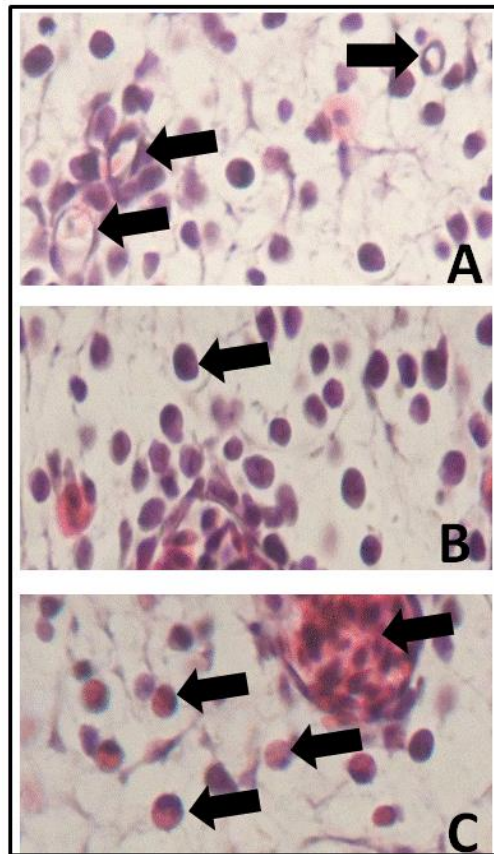


Figura 9. Imagens da CAM sobre os diferentes tratamentos para evidenciar os parâmetros avaliados. A) formação de novos vasos sanguíneos (neovascularização); B) elementos inflamatórios; e C) hiperemia.

Os resultados obtidos a partir da análise histológica estão apresentados na Tabela 3 e Figura 10, os quais estão de acordo com a análise de porcentagem de vascularização obtidas anteriormente pela avaliação de imagens utilizando o software do *Image J*. Na Figura 10, pode-se observar uma inibição evidente dos vasos sanguíneos nos grupos onde foram utilizados a dexametasona (controle inibidor) e a água (controle negativo) uma vez que estas áreas mostraram uma menor vascularização. Já o látex de mangabeira e o controle positivo apresentaram um aumento relevante na rede vascular. As setas mostram a presença de vasos neoformados nos controles à base de látex de mangabeira, enquanto que nos controles negativo e inibidor, observa-se que não há a formação de novos vasos sanguíneos. Também foi verificado que apenas nas membranas expostas ao látex de *Hancornia speciosa* ou ao Regederm® houve uma densa concentração de células inflamatórias, os quais são importantes para o processo de angiogênese.

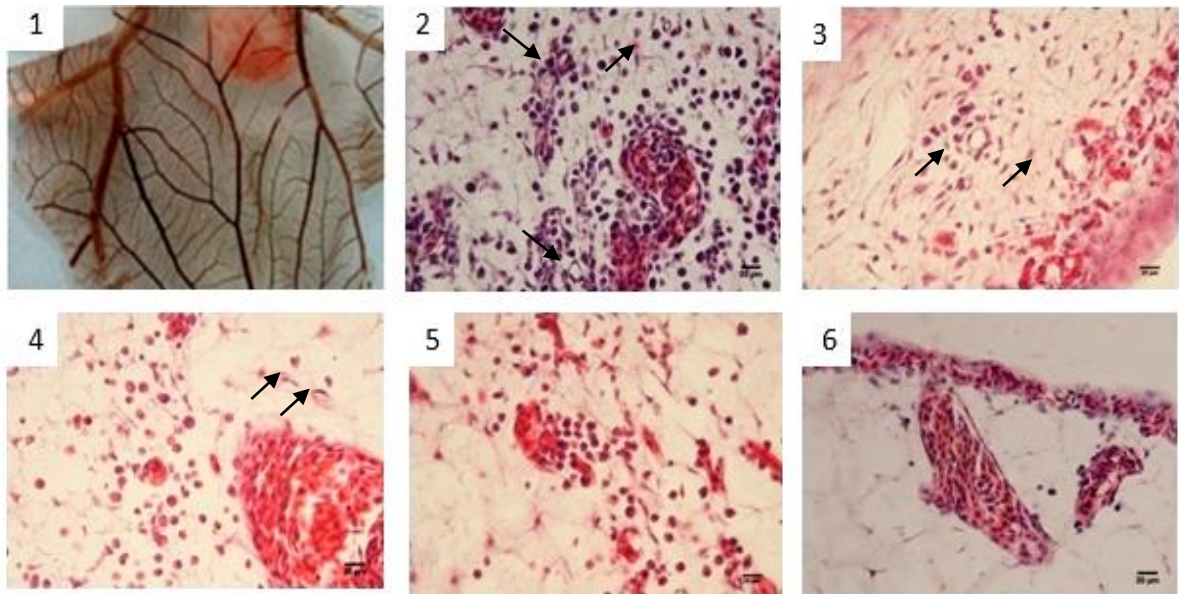


Figura 10: Imagens dos vasos neoformados da membrana CAM com diferentes tratamentos; 1) Membrana corioalantóide; 2) vaso tratado com látex diluído em amônia; 3) vaso tratado com látex diluído com água; 4) vaso com controle positivo (Regederm®); 5) vaso com tratamento negativo (água); 6) vaso com inibidor (dexametasona).

As análises estatísticas da histologia das CAMs submetidas aos diferentes tratamentos foram realizadas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Dados da análise histológica das CAMs de ovos de galinha fertilizados e seus respectivos tratamentos.

Tratamentos	Dados análise histológica			
	Lâminas	Inflamação	Hiperemia	Angiogênese
Látex Amônia	A	3	3	1
	C	2	3	3
	E	1	3	1
	G	1	0	0
	H	3	3	2
Látex Água	B	1	3	2
	C	2	3	1
	D	1	3	1
	I	1	3	1
Regederm®	G	1	3	2
	A	1	0	1
	B	2	3	2
	C	2	3	3
	F	1	3	0
Água	G	0	3	0
	D	1	3	1
	E	2	3	1
	G	1	3	0
	H	1	2	0
Dexametasona	I	1	2	0
	A	0	0	0
	B	0	1	0
	C	0	2	0
	D	0	2	0
	E	0	1	0
Kruskal Wallis		P = 0.05	P = 0.06*	P = 0.05

*Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Os resultados mostraram que os grupos de látex da mangabeira e Regederm® foram significativamente diferentes do controle negativo e inibidor nos parâmetros elementos inflamatórios ($P = 0,05$), neoangiogênese ($P = 0,05$). Já no parâmetro hiperemia não houve uma diferença significativa entre os tratamentos ($P = 0,06$).

A atividade angiogênica apresentada no presente trabalho, provavelmente, se deve à ativação de resposta inflamatória, causada pelo látex. Esta resposta é fundamental para que ocorra angiogênese, reparação de tecidos, cicatrização de feridas da pele e outros fenômenos biológicos essenciais para o ser vivo. Resultados semelhantes foram encontrados por Bessa (2010), com o látex de *Euphorbia tirucalli* Linnaeus (aveloz), o qual se observou uma inibição evidente dos vasos sanguíneos neoformados quando foi utilizada a dexametasona

(controle inibidor). O controle positivo e o tratamento com o látex da *E. tirucalli* apresentou um aumento significativo da rede vascular e do infiltrado de células inflamatórias. Neste caso, o látex de *E. tirucalli* provavelmente estimulou respostas inflamatórias, que devem ter propiciado a migração de neutrófilos e macrófagos, estimulando assim a formação de novos vasos.

5 CONCLUSÃO

Para a utilização de novos biomateriais na medicina são necessários alguns estudos sistêmicos de biocompatibilidade, para essa avaliação é utilizado o teste de *Allium cepa*, por meio do qual os resultados obtidos mostram que o látex de mangabeira não apresenta potencial citotóxico e genotóxico, nas concentrações testadas. Outro estudo que deve ser realizado é o da biofuncionalidade, para isso foi utilizado o ensaio da membrana corioalantóide (CAM), por meio do qual foi possível observar que o látex de mangabeira apresenta alto potencial angiogênico, assim como o produto comercialmente disponível (Regederm®) sintetizado a base de látex de seringueira, nas condições testadas. Esses são os principais requisitos para a aplicação de novos materiais em meios biológicos. Portanto esse trabalho permitiu a identificação do potencial genotóxico, citotóxico e angiogênico do látex de mangabeira agregam valor econômico a essa espécie, a qual tem sido utilizada principalmente para obtenção de frutos, podendo esse material ser utilizado futuramente como biomaterial.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRA, M.F.; FRANÇA, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn**, v.17, p. 114-140, 2007.
- AGUIAR FILHO, S. P. DE; BOSCO, J.; ARAUJO, I. A. DE. Banco ativo de germoplasma de mangaba no estado da Paraíba. In: Workshop para Curadores de Banco de Germoplasma de Espécies Frutíferas, 1997, Brasília. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 156-159, 1999.
- ALMEIDA, C. E. et al. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. **Rev. Saúde Pública**, v. 29, n. 6, p. 428-433, 2005.
- ALOUFA, M. A. I. et al. Multiplicação e conservação *in vitro* de mangabeira. In: Simpósio brasileiro sobre a cultura da mangaba, Aracaju, SE. Aracaju: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, CD-ROM, 2003.
- ARAUJO, M.M.; MASSUDA, E.T.; HUPPOLITO, M.A. Anatomic and functional evaluation of tympanoplasty using a transitory natural latex biomembrane implant from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Acta Cir. Bras.**, v. 27, p.566-571, 2012.
- AZZINI, A.; GONÇALVES, P.S.; TOMAZ, R.M.A.G. Sieve tubes diameter and the rubber production in rubber tree clones. **Bragantia**, v.57, n.1, p. 57-60, 1998.
- BALABANIAN, C.A.; et al. Biocompatibility of natural látex implanted into dental alveolus of rats. **Journal of Oral Science**, v. 48, p. 201-205, 2006.
- BEEZHOLD, D.H.; et al. A identificação de uma proteína alergênica 46-kD. **Látex em profissionais da saúde**, v.98 n.3, p. 408-413, 1995.
- BEILEN, J.B.; POIRIER, Y. Establishment of new crops for the production of natural rubber. **Trends Biotechnol**, v. 4. p.522–529, 2007
- BEKKEDAHL, N.; SAFFIOTI, W. Latex e borracha de mangabeira. **Instituto Agrônomo do Norte**, v.11, p.421, 1998.
- BESSA, G.O. Avaliação da atividade angiogênica e do potencial de cicatrização do látex de *Euphorbia tirucalli* (aveloz). Universidade Católica de Goiás. **Dissertação de mestrado**, Mestrado em ciências ambientais e saúde, p. 50, 2010.
- BORGES, J. et al. Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering: a new twist on a classic model. **Tissue Eng.**, p.441–4509, 2003.
- BORGO, J; ROSA, D.P; VARGAS, V.M.F. Mutagenicidade do extrato aquoso de *Baccharis articulata* (Lam.) Person no ensaio salmonella/microsoma. **Rev. Bras. Toxicol.** v. 7, p.37-43, 2004.
- BOUSQUET, J. et al. Natural rubber latex allergy among health care workers: a systematic review of the evidence. **J. Allerg. Clin. Immunol.** v.118, p.447–454, 2006.

- BRANDÃO, M. L., et al. Prótese vascular derivada do látex. **Journal of Vascular Bras.**, v. 6, n.2, p.130-141, 2007.
- CABAÑES, N; et al. Latex Allergy: Position Paper. **J. Investig Allergol Clin. Immunol**, v. 225, p.313-330, 2012.
- CABRERA, G.L.; RODRIGUEZ, D.M.G. Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays. **Mutat. Res.**, v. 4, p. 211-214, 1999.
- CALLAHAN, L. M; NATALE, P. M. The origin of bermudagrass (*Cynodon*) off-types inferred by DNA amplification fingerprinting. **Crop. Science**, v. 37, p. 81-87, 2008.
- CARVALHO, B.R., et al. Natural latex (*Hevea brasiliensis*) mold for neovaginoplasty. **Rev. Bras.Ginecol Obstet**, v.30, n.1, p.31-35, 2008.
- CERISE, E. J. et al. The use for mersilene mesh in repair of abdominal wall hernias. **Ann. Surgery**, v. 181, p. 728-34, 1974.
- CHAVES, L. J. E; MOURA, N. F. Recursos genéticos da mangabeira no bioma Cerrado. In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura da mangaba, 2003, Aracaju, SE. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2003.
- DAVIS, W. The rubber industry's biological nightmare. v.8, **Fortune**, v.5, p.86-95, 2011.
- DEMIRCI, M. et al. The induction of oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity by dental adhesives. **Dental Materials**, v.24, p.362-371, 2008.
- DIANA, F.; FERNANDÉZ, V.; TORRES, E. Evaluacion de la actividad genotóxica de efluentes de curtiembres del Depto. Central de la region oriental. **Revista de Ciência y Tecnologia**, v. 2, p. 37-48, 2000.
- DONÀ, M; et al. Neutrophil Restraint by Green Tea: Inhibition of Inflammation, Associated Angiogenesis, and Pulmonary Fibrosis. **Journal of Immunology**, v.7, p. 4335-4341, 2003.
- ERENO, C.; et al. Latex use as na occlusive membrane for guided bone regeneration. **J. Oral Sci.**, v.48, n.4, p. 201-205, 2006.
- FACHINETTO, J.M.; BAGATINI, M.D.; DURIGON, J.; DA SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S.B. Efeito anti-proliferativo das infusões de *Achyrocline satureioides* DC (Asteraceae) sobre o ciclo celular de *Allium cepa*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 49-54, 2007.
- FERREIRA, H.C., et al. Endothelium-dependent vasodilatation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, p.473-478, 2011.
- FERREIRA, M.; et al. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Heveabrasiliensis*. **Brazilian Journal of Physics**, v. 39, n.3, p. 564-569, 2009.

FLORIANO, J. F., et al. Biocompatibility studies of natural rubber latex from different tree clones and collection methods. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine (J. Mater. Sci. Mater. Med.)**, 2013, DOI 10.1007/s10856-013-5089-9.

FRADE, M.A; et al. Úlcera de perna: um estudo de casos em Juiz de Fora-MG (Brasil) e região. **Bras. Dermatol.**, p.41-6, 2010.

FISKESJO, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, p. 99-112, 1985.

FOLKMAN, J. et al. Angiogenetic factors. **Science**, p.442–447, 1987.

GONZALEZ, S; et al. An extract of the fern *Polypodium leucotomos* (Difur) modulates Th1/Th2 cytokines balance *in vitro* and appears to exhibit anti-angiogenic activities *in vivo*: pathogenic relationships and therapeutic implications. **Anticancer Research**, p.567–575, 2003.

GRANT, W.F. Chromosome aberrations in plants as a monitoring system. **Environ Health Persp.**, p.37- 43, 1994.

GREEN, R.M. Fluorescent protein imaging of tumor growth, metastasis, and angiogenesis in mouse models. **Lancet. Oncol.**, p.546–556, 2001.

GUARIM NETO, G. Plantas utilizadas na medicina popular do estado de Mato Grosso. **Ministério da Ciência e Tecnologia**, p.58, 1997.

HAMILTON, R.G. Clinical and laboratory-based methods in the diagnosis of natural rubber latex allergy. **J Allergy Clin. Immunol.**, p.47-56, 1965.

HENCH, L. Biomateriais: fundamentos e aplicações. **Cultura Médica**, v.3, p.1-7, 2006.

ILLANES, J. et al. Ethanol effect on the chick embryo ossification: a macroscopic and microscopic study. **Biol. Res.**, p. 77-84, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 de outubro de 2013.

ISO 10.993-3: International standard: Biological evaluation of medical devices – part 3. Tests for citotoxicity: *In vitro* methods **ISO 10993-3**, 1992.

KAO, C. T. et al. The cytotoxicity of orthodontic metal bracket immersion media. **Eur. J. Orthod.**, v. 29, n. 2, p.198-203, 2011.

KATRANCIOGLU, R.T. et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant J.**, v. 37, p. 370-378, 2012.

KEKWICH, H. et al. Mitodepressive effect of Khat extract in the meristematic region of *Allium cepa* root tips. **Cytologia**. v. 45, p.733-738, 1996.

LEDERMAN, I.E. et al. Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). Jaboticabal, SP: **Funep**. p. 35, 2000.

- LEVAN, D.G. IgE-mediated natural rubber látex allergy: an update. **Acta Clin. Belg.**, v. 57, p. 58-70, 1938.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação de plantas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Platarum**, 368 p. 1992.
- KABARITY, et al. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. **Wound Healing**. p. 45-63, 2008.
- LA GRUTA, et al. Anti-inflammatory activity of the flavonoid fraction of Khat (*Catha edulis*). **Agents and Action**. V.17, p.3-4, 2003.
- MALMONGE, J.A. et al. Comparative study on technological properties of latex and natural rubber from *Harcornia speciosa* Gomes and *Hevea brasiliensis*. **Journal of Applied Polymer Science**, v.111, p. 2986–2991, 2009.
- MARINHO, D.G. et al. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.3, p. 530-537, 2011.
- MATSUMOTO, H. et al. Cyclooxygenase-2 differentially directs uterine angiogenesis during implantation in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v.2, p. 29260-29267, 2007.
- MAY, AE., SEIZER, P. and GAWAZ, M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 3, p. 5-10, 2008.
- MELO-REIS, P.R.; et al. Angiogenic activity of *Symadenium umbellatum* Pax latex. **Braz. J. Bio.**, v. 70, p. 189-194, 2010.
- MENG, R. et al. Pharmacological properties of the stimulant Khat. **Pharmacol. Ther.** v.48, p.397-416, 2003.
- MILLER, R.C. The micronucleus test as an *in vivo* cytogenetic method. Environmental Health Perspectives. **Institute for Medical Research Camden**, p. 143, 1973.
- MITCHELL, R. N. Disfunções hemodinâmicas, doenças trombo-embólica e choque. In: ROBBINS & COTRAN (Ed.) Patologia – bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: **Elsevier**. p. 1592, 2005.
- MONACHINO, J. A. A revision of *Hancornia* (Apocynaceae). **Lilloa**, v.11, p. 19-48. 1945.
- MORAES, T.M. et al. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 161-168, 2008.
- MOSTAFA, L.; JONES, D.; WRIGHT, D. Mechanisms of the induction of angiogenesis by human neoplastic lymphoid tissue: studies on the chorioallantoic membrane (CAM) of the chick embryo. **J. Pathol**, v. 132, p.191-205, 1980.
- MOURA, M. D. et al. Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, n.3, p. 421-446, 2002.

MOURA, N. F. Recursos genéticos da mangabeira no bioma Cerrado. In: Simposio Brasileiro sobre a cultura da mangaba, Aracaju, SE. Anais. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2003.

MRUÉ, F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães. 2000. 112f. **Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária)**, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.

MRUÉ, F. Substituição do esôfago cervical por prótese biossintética de látex. Estudo experimental em cães. **Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)**, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 86f., 1996.

OLIVEIRA, J. A. A. et al. Miringoplastia com a utilização de um novo material biossintético. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, p. 649-55, 2003.

PANDA et al. Dose-dependent metabolism, therapeutic effect, and toxicity of anticancer drugs in man. **Drug Metab Rev.**14: 1145-1163, 2005.

PELE NOVA. Regedem® e Biocure, Pele Nova Tecnologia S.A. Disponível na internet: **HTTP://www.pelenova.com.br/site**. Acesso em 12 de outubro de 2013.

PERRELLA, R. J. Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira – *Hevea brasiliensis*. **Tese de Mestrado**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, 2002.

PINHEIRO, C. S. R. et al. Germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa Gomez*) em diferentes meios de cultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.23, p.413-416, 2001.

PINHEIRO, E. O latex e a borracha da mangabeira. In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura da mangaba, 2003, Aracaju, SE. Anais, Aracaju: **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2003.

PRIMACK, R. B. Essentials of conservation biology. **Massachusetts: Sunderland**, v.6, p.546, 1993.

QUIGLEY, J.; ARMSTRONG, P. Tumor cell intravasation elucidated: The chick embryo opens the window. **Cell**, v. 94, p. 281-284, 1998.

RIBATTI et al.; Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis *in vivo*, **Anat. Rec.**, v.4, p. 317–324, 2001.

RODGERS, B. M.; et al. The use of preserved human dura for closure of abdominal wall and diaphragmatic defects. **Annals Surgery**, v. 193, n. 5, p. 606-611, 1981.

RODRIGUEZ, E.R; et al. A Hematological evaluation of carqueja (*Baccharis trimera*) infusion. **Fitoterapia**.v.6, p.26-26. 1999.

ROSSI, D; et al. Evaluation of the mutagenic, antimutagenic and antiproliferative potential of *Croton lechleri* **Muell. Arg. latex. Phytomedicine**, v. 10, p. 139-144, 2003.

SAFATLE, A. M. V. et al. Implante de duas membranas biológicas em microbolsa corneana como modelo experimental de angiogênese. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.7, p. 189-195, 2002.

SALGADO, R.P.; et al. Teste de biocompatibilidade e resistência de membranas de látex em cães. **Ciência Rural**, p.1719-1723, 2004.

SAMPAIO, F.A. Avaliação pré-clínica dos possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos e mutagênicos da morfina e de seu co-tratamento com o composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)imidazolidina-2,4-diona (PT -31) em *Allium cepa* e em *Mus musculus*. **Dissertação**, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí. p.129. 2012.

SAMPAIO, T.S. Estudo fotoquímico de *Hancornia speciosa* Gomes: Isolamento, determinação estrutural e atividade biológica. **Dissertação (Mestrado Química)**-Universidade Estadual de Sergipe, 2008.

SAMPAIO, R.B. et al. Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogenic derived fraction: an experimental model. **Curr. Eye. Res.**, v.35, p.56-62, 2010.

SANTOS, M. H. et al. Um espalhador de baixo custo de fase estacionária em placas para cromatografia em camada delgada. **Quím. Nova**, v. 30, n. 7, p. 1747-1749, 2007.

SCHAIRER, A. E.; KEELEY, J. L. Experimental use of homologous fascia lata to repair diaphragmatic defects in dogs. **Surgery. Gynecology. Obstetric**. v. 105, p. 565-568, 1957.

SCOTT, B.T., VANHOUTTE, P.M. Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors. **Texas Heart Institute Journal**. v.9, p.91-97, 2002.

SETH, C.S. et al. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and comet assay approach. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 71, p. 711-716, 2008.

SILVA C.G. et al. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 709-711, 2011.

SILVA JUNIOR, J. F. Recursos genéticos da mangabeira nos tabuleiros costeiros e baixada litorânea do nordeste do Brasil. In: Simpósio Brasileiro sobre a cultura da mangaba, Aracaju, SE. Anais. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, 2003.

SILVA, E. B. et al., Palatoplastia com biomembrana natural de látex com polilisina 0,1% em cães com defeito palatino experimentalmente induzido. **Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária)**, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.

SISVAR. **Sisvar for Windows v. 5.3**: Computer program manual. Tulsa, OK:StatSoft Inc., 2010.

SOUZA, V.A.B. Perspectivas do melhoramento de espécies nativas do nordeste brasileiro. In: Congresso brasileiro genético de plantas, Goiânia. Resumo 25, **Embrapa Meio-Norte**, 2001.

STATON, CA.; et al. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. **International Journal of Experimental Pathology**, p. 233-248, 2004.

STREISSLE, C.S; et al. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.7, p. 711–716, 1981.

SUDHAKAR,R. et al. . Mechanisms of the origin of chromosomal aberrations. **Mutat. Res.** v.20, p.403-416, 2001.

TEIXEIRA, R.O; et al. Assessment of two medicinal plants, *Psidiumguajava* L. and *Achillea millefolium* L., *in vitro* and *invivo* assays. **Genet. Mol. Bio.** v.5. p.551-555, 2003.

VARGAS, A; et al. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the *in vivo* evaluation of drug delivery systems. **Science Direct.** v.4, p.1162-1176, 2007.

VEDULA, R.P.M; et al. The designed angiostatic peptide anginex synergistically improves chemotherapy and antiangiogenesis therapy with angiostatin. **Cancer Res.** v.63, p.382–385, 2008.

VICENTINI, V.E.P; et al. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta. Scientiarum.** V.6, p.593-598, 2001.

VIEIRA-NETO, R. D. Caracterização física de frutos de uma população de mangabeiras (*Hancornia speciosa* Gomes). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.19, p.247-250, 1997.

WIEGAND, C.; HIPLER, U.C. Methods for measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration processes. **Krankenaushygiene Interdisziplinar**, v.11, p.1863-5245, 2008.

ZIEREN, S.L; et al. Can angiogenesis be exploited to improve stroke outcome. Mechanisms and therapeutic potential. **Clinical Science**, p. 171-183, 1998.

ZIJLSTRA, A. et al. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. **Blood**, v. 5, p. 317-327, 2006.

ZWADLO-KLARWASSER, G. et al. The chorioallantoic membrane of the chick embryo as a simple model for the study of the angiogenic and inflammatory response to biomaterials. **Journal of materials science: materials in medicine**, v.9, p.195-199, 2001.

7 ANEXOS

*Artigo submetido para publicação no periódico *Journal of Ethnopharmacology* (ISSN:0378-8741; Fator de impacto: 2,75).

Angiogenic efficacy of *Hancornia speciosa latex*

Luciane M. Almeida^{1*}, Thuanne Pires Ribeiro¹, Juliana Floriano², Lais Nogueira Magno³, Carlos Frederico de Oliveira Graeff², Nei Peixoto¹, Fátima Mrue⁴, Paulo Melo-Reis⁵, Ruy de Souza Lino Junior⁶, Pablo José Gonçalves³

¹Universidade Estadual de Goiás (UEG), UnU-Ipameri, GO.

²Faculdade de Ciência de Bauru – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Bauru, SP.

³Instituto Física – Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO.

⁴Departamento de Medicina, Pontifícia Universidade Católica de Goiás –PUCGo.

⁵Departamento de Biomedicina, Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos, Pontifícia Universidade Católica de Goiás –PUCGo.

⁶Institute of Tropical Pathology and Public Health, UFG, Goiás, Brazil.

***Corresponding author:** Luciane Madureira de Almeida, Universidade Estadual de Goiás, Rodovia GO 330, km 241 – Anel Viário, S/N, Ipameri, CEP: 75.780-000, Brazil. Tel: 55 62 36614330; Fax: 55 62 35211110.

E-mail: almeidalm@hotmail.com

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The latex obtained from *Hancornia speciosa*, a plant native to Brazil popularly known in Portuguese as “mangabeira”, is used in folk medicine for treatment of several diseases, such as acne, warts, diabetes, gastritis and inflammation. In this work, we describe the biocompatibility assessment and angiogenic properties of *H. speciosa* latex and its potential application in medicine.

Methods: The biomembranes were obtained by pouring the latex solution in a petri plate where it was left to complete polymerization at 55°C. The physical-chemical characterization was carried out following different methodologies (CHN elemental analyses; thermogravimetric analyses and Fourier transform infrared spectroscopy). The biocompatibility was evaluated through cytotoxicity and genotoxicity tests in fibroblast mouse cells and the angiogenic properties were evaluated using the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay model.

Results: The physical-chemical results showed that the structure of *Hancornia speciosa* latex biomembrane is very similar to that of *Hevea brasiliensis* (commercially available product). Moreover, the cytotoxicity and genotoxicity assays showed that *Hancornia speciosa* latex is biocompatible with life systems and can be a good biomaterial for medical applications. The CAM test showed the efficient ability of *Hancornia speciosa* latex in neovascularization of tissues. The histological analysis was in accordance with the results obtained in the CAM assay.

Conclusions: Our data indicate that the latex obtained from *H. speciosa* and eluted in water showed significant angiogenic activity without any cytotoxic or genotoxic effects on life systems. The same did not occur with *H. speciosa* latex stabilized with ammonia. Addition of ammonia does not have significant effects on the structure of biomembranes, but showed a smaller cell survival and a significant genotoxicity effect. This study contributes to the understanding of the potentialities of *Hancornia speciosa* latex as a source of new phytomedicines.

1. Introduction

The World Health Organization has estimated that 80% of the world's population relies solely or largely on traditional medicines for health care (Bannerman, 1982) and there is speculation that more than two billion people may be heavily reliant on medicinal plants (Lambert et al., 1997, Smith-Hall et al 2012). Plant latex is generally composed of a milky exudate whose function is to protect the plant (Konno et al., 2004). There are more than 35,000 lactiferous species whose latex has bioactive compounds used in folk medicine (Konno et al., 2004). The potential for finding new therapeutic compounds in latex is enormous since currently only about 1% of tropical plant species have been thoroughly studied for their pharmacological potential (Gurib-Fakim, 2006).

Recently, some reports have described promising results in the use of latex extracted from the *Hevea brasiliensis* rubber tree to produce replacement and regeneration tissues. It has been showed that biomembranes produced with that natural rubber latex not only are biocompatible but also stimulate angiogenesis, cellular adhesion and extracellular matrix formation (Floriano et al., 2013; Frade et al., 2012). Such properties can be observed in studies of different tissues, such as wound healing in cutaneous tissues (Frade et al., 2012); eardrum replacement (Araujo et al., 2012); bone regeneration (Martins et al, 2010; Ereno et al, 2010; Herculano et al, 2009); retina restitution (Sampaio et al., 2010); neovaginoplasty (Carvalho et al., 2008); dental alveolus replacement (Balabalian et al., 2006) and others. Besides the pharmacological potential, some people show allergy to *Hevea brasiliensis* latex (Ebo and Stevens, 2002; Yagami et al., 2004). The allergy is due to at least 13 proteins present in this latex, of which Hevb3 and Hevb1 are frequently associated with latex allergy in individuals with spina bifida (Akasawa et al., 1995; Czuppon, et al., 1993; Wagner et al., 1999; Berthelot et al., 2012). This fact alone is a good reason to search for other lactiferous species, which can produce bioactive latex with low allergenic potential.

The latex obtained from *Hancornia speciosa*, a plant native to o Brazil, typically found in the Amazon Rainforest and in the *Caatinga* and *Cerrado* vegetations, can be an interesting alternative for biomembrane production for medical application. The low protein content of *Hancornia*, when compared to *Hevea*, is one of the most remarkable findings of Malmonge et al. (2009) who suggest that *Hancornia* has the potential to have less allergic components. Another positive characteristic of this species is its subproducts, which have commercial value or at least potential. For example, the fruit, known as mangaba, can be consumed fresh or as juice, ice cream, jelly and liqueur (Sampaio and Nogueira, 2005). The extract obtained from the leaves has a hypotensive effect more efficient and effective than

some commercially available drugs (Ferreira et al. 2007a, b; Silva et al., 2011). Different flavonoids, catechins, anthocyanins and tannins can be extracted from the bark and are used in folk medicine to treat gastritis caused by *Helicobacter pylori* (Moraes et al., 2008), or to stimulate liver functions, to treat diabetes, hypertension and dermatitis (Macedo and Ferreira, 2004; Ritter et al., 2002). Recently, the latex from this species was shown to present anti-inflammatory activity (Marinho et al., 2011).

Currently, despite its pharmacological and economic potentials, *H. speciosa* is exclusively cultivated for its fruits, with few commercial plantations in Brazil (Carvalho et al., 2001). In most states, the fruit production is based on extractive activity, with a variable production, for example of 999 tons in 2004 and 711 tons in 2008 (Brazilian Institute of Geography and Statistics, 2010).

The aim of this work is to evaluate the *H. speciosa* latex potential in medicine as a biomaterial to stimulate angiogenesis. Angiogenesis is a complex biological process that favors the formation of new blood vessels from preexisting vascular tissue by the proliferation, migration, regulation and differentiation of vascular cells (Folkman, 2003). From the point of view of medical applications, materials that induce angiogenesis are important for tissue engineering, to enhance cell proliferation or to promote wound healing (Schultz et al., 2003; Shen and Falanga, 2003). Implantable materials are required to be immunogenic and must have no inflammatory reactions (Zisch et al., 2003). In this work the potential of *Hancornia speciosa* latex as a biomaterial for medical applications was evaluated. For that purpose the physical and chemical characteristics of biomembranes were studied, as well as the effect of latex collection and sterilization methodology. The latex biocompatibility was evaluated *in vitro* through cytotoxicity and genotoxicity tests. Finally, the angiogenic potential was assessed *in vivo* through the use of chicken egg chorioallantoic membrane model (CAM).

2. Material and methods

2.1. Latex extraction

The latex of *H. speciosa* was collected from Universidade Estadual de Goiás tree collection, in the city of Ipameri, (State of Goiás – Brazil). A voucher specimen was deposited at the State University of Goiás Herbarium (Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, Goiás, Brazil); the exsiccate received the number 4875. The latex was collected in a sterile container by drilling in the tree trunk. The incision in the bark was made with a knife and the cut had approximately 10 cm length and 0.5 cm depth. The latex milk was submitted

to different methodologies to prevent coagulation. In one group (called LW group), distilled water was added in 1:1 proportion (latex:water), in the other (called LA group) 0.1% of ammonia solution was added.

2.2. *Latex biomembranes*

The latex was centrifuged for 5 min at 3,000 rpm to remove impurities gathered in the collection process. The biomembranes were prepared by pouring the latex solution (10 ml) in a petri plate with a diameter of 10.00 ± 0.05 cm. Typically they were left for 3 days at 55°C to complete the polymerization. At the end of this process, the biomembranes were carefully removed from the petri plates with the help of tweezers. These membranes were sterilized using an industrial Cobalt-60 gamma ray irradiator, Gammacell 220 from IPEN (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo - Brazil). A dose of 25 kGys was used, in accordance to ISO 11.137.

2.3. *Physical and chemical characterization*

Fourier transform infrared (FTIR) spectra were recorded with a Vertex 70 spectrophotometer, from Bruker. The biomembrane spectra were obtained in the range of 400 to 4000 cm^{-1} in the attenuated total reflectance (ATR) mode. Thermogravimetric analyses (TGA) were carried out with a Shimadzu thermoanalyzer, model DTG 60/60H. Dynamic scans were conducted in a temperature range from 25 to 600°C , at constant heating rates of $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, under nitrogen atmosphere. Elemental analyses were carried out in a Flash 2000 - Thermo Scientific analyzer. With this method, the carbon, hydrogen and nitrogen content were measured with a stated accuracy of $\pm 0.3\%$.

2.4. *Cell viability and Cytotoxicity*

Cell viability was determined using the neutral red (NR) assay based on lysosomal accumulation of NR in viable cells (Borenfreud and Puerner, 1985). First, mouse fibroblast NIH cells of the line NIH3T3 were cultivated in Ham's medium supplemented with 20% fetal calf serum, 1% penicillin and 1% streptomycin at 37°C with 5% CO_2 . Cell growth was followed by microscopy until the maximum proliferation was reached. After that the cells were treated with trypsin for 3 min, washed with Ham's medium and transferred to new tubes. For the experiments, 2.5×10^5 cells were placed in 48-well plates for 24h for growth and formation of a cell monolayer. The latex biomembrane was then added to each well and incubated for 24, 48, and 72 hours. Different experimental groups were used in triplicate: 1.

Negative control (culture medium); 2. Positive control (phenol 0.2%); 3. *H. speciosa* biomembrane (LW group) and 4. *H. speciosa* biomembrane (LA group). After incubation, the plates were maintained for 24h at 37°C and 5% CO₂. Fresh media containing 50 µg/ml NR was added to each well (eluted with 2 ml of 0.5% acetic acid/50% ethanol solution). Washing steps with PBS were performed. The resulting NR solution was allowed to incubate for a further 1 h at room temperature to allow proper mixing. Two hundred microliters of NR solution were added to a microliter plate. After rapid shaking by the plate shaker, the optical density (OD) was measured between 540-570 nm (Organon Teknika Reader 530 version 1.24). The average of each set was established, and from this, the media background average was subtracted to allow calculation of the total percent viability by comparing each value to the negative control. Statistical analyses were performed using ANOVA and Kruskal-Wallis tests. P values of less than 0.01 (P<0.01) were considered as indicative of significance.

2.5. DNA damage / Comet assay

After being in contact for 72 h with *H. speciosa* biomembranes, the mouse fibroblast cells cultivated as described in the previous section were submitted to the comet assay to evaluate DNA damage, according to the method previously described by Singh et al. (1994) with small modifications. Briefly, cells in 5 µL medium were suspended in 120 µL of warm 0.5% low-melting-point (LMA) agarose (Invitrogen) and were quickly pipetted onto a prepared cooled slide coated with 80 µL of 1.5% normal-melting (NMA) agarose (Invitrogen). Slides with cell suspension were covered with glass coverslips and subsequently placed overnight in a Coplin jar containing cooled lysis solution (10% DMSO, 1% Triton X in alkaline lysis buffer: 2.5 mM NaCl, 10 mM Tris, 100 mM Na₂EDTA, pH 10) to completely digest cellular proteins. Next, the slides were removed from the lysis solution and placed in a horizontal gel electrophoresis unit filled with cold electrophoresis buffer (0.3 M NaOH and 1 mM Na₂EDTA at pH 13.2). Slides were allowed to sit in the alkaline buffer for 20 min to allow unwinding of the DNA strands and expression of the alkali-labile damage. Electrophoresis was performed for 20 min at 300 mA and 25 V. Following dropwise neutralization (0.4M Tris-HCl, pH 7.5) for 5 min, cells were stained by applying 50 µL of 20 µg/ml ethidium bromide. The slides were examined and the tail length was measured with a fluorescence microscope and appropriate software (Comet II; Perpective Instruments, Suffolk, UK). The DNA migration of 50 randomly selected cells was examined for each sample. Statistical analyses were performed using ANOVA and Kruskal-Wallis tests. P values of less than 0.01 (P<0.01) were considered as indicative of significance.

2.6. Angiogenic potential / CAM assay

The chorioallantoic membrane (CAM) model was used for evaluation of the angiogenic activity according to a methodology adapted from Melo-Reis (2010). One hundred fertile chicken eggs (*Gallus domesticus*) were incubated at 37°C in a humidified atmosphere (60-70% relative humidity). On the 5th day of incubation, a circular hole was opened in the large end of the eggshell, the CAM membrane was removed, and the eggs were returned to the incubator. Filter paper disks were soaked in 3 µL of the following solutions: 1. *H. speciosa* latex eluted in water (LW group); 2. *H. speciosa* latex stabilized in ammonia (LA group); 3. Regederm - commercial product from Pele Nova Biotecnologia prepared with *Hevea brasiliensis* latex (positive control); 4. water (negative control); and 5. dexamethasone (inhibitor). After receiving the treatment solutions, the filters were placed on top of the growing CAM at day 13 of incubation under sterile conditions. The angiogenic response was evaluated 72 hours after incubation. CAMs were fixed in formaldehyde solution (3.7%) for 5 minutes, cut with curved blunt scissors and maintained in Petri dishes in the presence of formaldehyde solution. Analysis and quantification of newly-formed vascular net were made through captured images. The area of each assay was determined using the programs *Gimp for Windows* (version 2.0.5) and *Image J* (NIH) (version 1.28). The images were prepared so that saturation, light and contrast allowed a better resolution of the blood vessels which were quantified in each corresponding pixel (Doukas, 2006; Melo-Reis et al., 2010; Parente et al., 2011). In order to analyze the angiogenic activity of *H. speciosa* latex, the treated and control groups were compared using one way variance analysis (ANOVA) on ranks, followed by Tukey test. P values of less than 0.05 (P<0.05) were considered as indicative of significance.

2.7. Histology of the CAM blood vessels

The membranes fixed in formaldehyde solution (3.7%) were processed, included in paraffin, marked by hematoxylin and eosin and examined by microscopy. Different parameters were evaluated such as: chorionic and allantoic epithelial layer integrity, presence of inflammatory elements, hyperemia and neovascularization. The results were visually classified according to the found intensity, and the data were transformed into quantitative variables, by assigning the following scores: absent (0), discrete (1 to 25%), moderate (26 to 50%), and accentuated (over 51%). The results were evaluated using Kruskal-Wallis test with significance level of 5% (P < 0.05).

3. Results

3.1. Physical and chemical analysis

In order to characterize the physical and chemical properties of *Hancornia speciosa* biomembranes, we compared this latex with the well studied latex from *H. brasiliensis*. Three methodologies were used: 1. CHN elemental analyses were used to evaluate the main components of the latex and the effect of ammonia on the biomembrane structure; 2. TG was used to evaluate the effect of temperature and ammonia on the biomembrane structure and stability and 3: FTIR was used to evaluate the effect of ammonia and gamma radiation on the biomembrane structure.

Results of the elemental analyses are displayed in Table 1. These results show that there are no significant differences between the *H. speciosa* and *H. brasiliensis* biomembranes ($P > 0.5$ for all variables). For all samples studied, carbon represents the main component of the biomembrane (80%) followed by hydrogen (11%) and nitrogen (0.5%). The presence of ammonia in the biomembranes causes a slight increase in the nitrogen component as expected.

Table 1. CHN elemental analyses of the studies biomembranes. Experiments were performed in triplicate and the values represent the average \pm SD.

Biomembranes	C (%)	H (%)	N (%)	others (%)
<i>H. speciosa</i> in water (LW)	80 \pm 2	11.4 \pm 0.1	0.08 \pm 0.03	8.5 \pm 2.1
<i>H. speciosa</i> in ammonia (LA)	82 \pm 2	11.4 \pm 0.1	0.4 \pm 0.1	6.2 \pm 2.6
<i>H. brasiliensis</i> in water (HW)	82 \pm 1	11.3 \pm 0.1	0.6 \pm 0.2	6.1 \pm 1.6
<i>H. brasiliensis</i> in ammonia (HA)	82 \pm 0.5	11.4 \pm 0.1	0.7 \pm 0.02	5.9 \pm 0.6

The TG results presented in Figure 1 show that the biomembranes from *H. speciosa* and *H. brasiliensis* have a similar thermal behavior. However, the thermal decomposition of *H. speciosa* starts at lower temperatures. The main decomposition process is better characterized through the maximum of the first derivative (DTG) curves and was found to happen between 370 and 380°C (data not shown). The DTG results show that the presence of ammonia reduces the maximum of DTG curves from 377 to 375°C for *H. speciosa* membrane, and from 378 to 376°C for *H. brasiliensis* membrane. The end of the thermal decomposition process occurred above 560°C with less than 2.0% of char yield. This result is an indicative that *H. brasiliensis* rubber extracted is more thermally stable than *H. speciosa* rubber. Ammonia

makes the biomembrane slightly less thermally stable and, besides that, for both biomembranes in ammonia, a small band close to 450 °C can be seen (see inset of Figure 1).

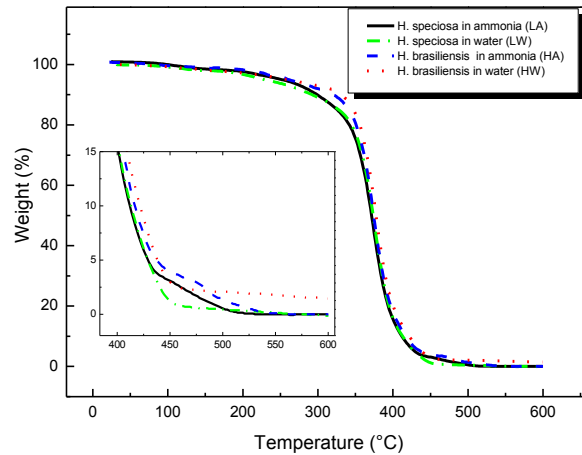


Figure 1. TGA weight loss curves for biomembranes of *H. speciosa* and *H. brasiliensis* in water and ammonia. The inset shows a zoom for temperatures between 400 to 660°C.

Figure 2 shows the FTIR spectra of *H. brasiliensis* (a), *H. speciosa* (b), *H. speciosa* treated by ^{60}Co gamma irradiation (c), and *H. speciosa* in ammonia (d). The results show that both biomembranes (*H. brasiliensis* and *H. speciosa*) have a similar composition and the main component is the cis-1.4-polyisoprene (Figure 2(a) and (b)). In addition, Figure 2 (c) and (d) shows that the use of ammonia as a stabilizing agent and of gamma irradiation does not cause significant changes in the structure of the biomembranes. However, Figure 2 (c) shows slight changes in the bands at 1600, 1448, 1377 and 837 cm^{-1} which can be attributed to formation of oxydation products (Polovková et al., 2006). In Figure 2 (d), the slight increase in the band at 1543 cm^{-1} is probably associated to the formation of amide groups due to the reaction of ammonia with the biomembrane (Floriano, et al., 2013).

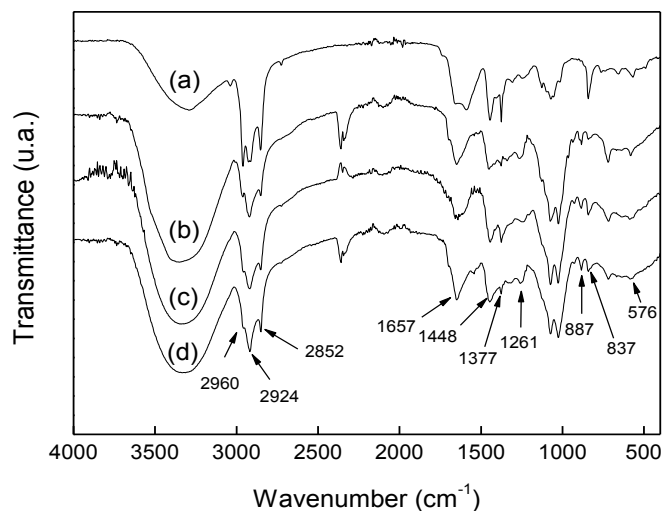


Figure 2. FTIR spectra of the studied biomembranes. Biomembranes of *H. brasiliensis* (a), *H. speciosa* (b), *H. speciosa* treated by ^{60}Co gamma irradiation (c), and *H. speciosa* in ammonia (d). The bands indicated are attributed to cis-1.4- polyisoprene [dos Santos et al., 2005; Malmonge et al. 2009].

3.2. Biocompatibility

Biocompatibility has become the main requirement for medical application of materials and devices. The determination of cytotoxicity and genotoxicity is part of the initial evaluation process stipulated by ISO standards (10993-3; 10993-5). Therefore, we initiated the analysis of *H. speciosa* biomembrane with cytotoxicity and genotoxicity assays under *in vitro* conditions using mouse fibroblast cells. Assessment of cell viability using the NR dye uptake assay was done according to ISO 10993-5 recommendations. Figure 3 shows that *H. speciosa* biomembranes are not toxic. Comparison between *H. speciosa* biomembranes prepared with water (LW group) and with ammonia (LA group) shows that a smaller cell survival is observed when ammonia is used. In addition, only the positive control showed a high cell death.

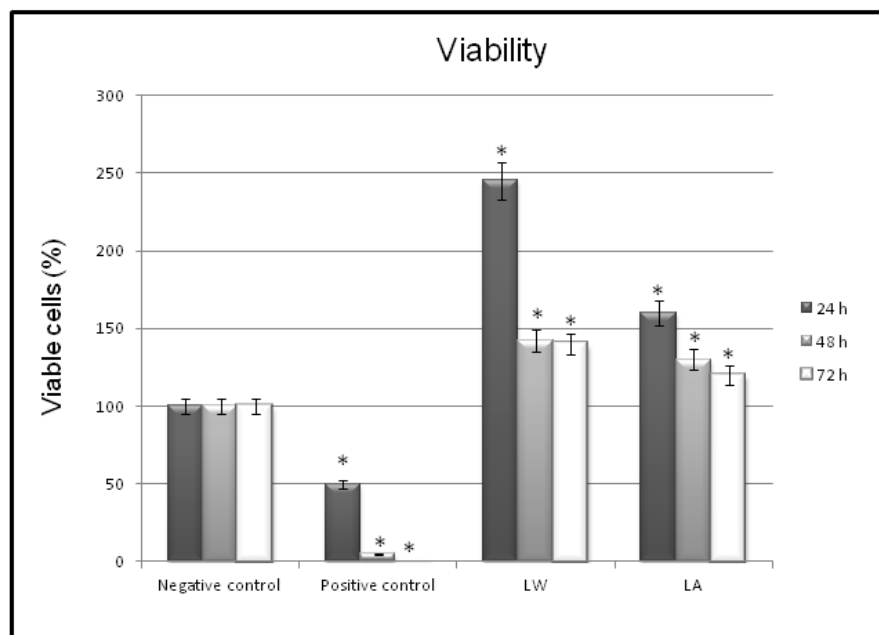


Figure 3: Cell viability using the NR dye uptake assay. The bars represent the average \pm SD of three different assays. P values of less than 0.01 were considered as indicative of significance (*).

The single cell gel (comet) assay was used to measure DNA damage in mouse fibroblast cells *in vitro* after 72 h of exposition to latex. DNA strand breaks were represented by tail moment and tail intensity for 50 comets per sample (Figure 4 a,b). *H. speciosa* biomembranes prepared with water did not induce DNA damage ($P < 0.05$), however there is a significant increase in DNA damage in the LA group.

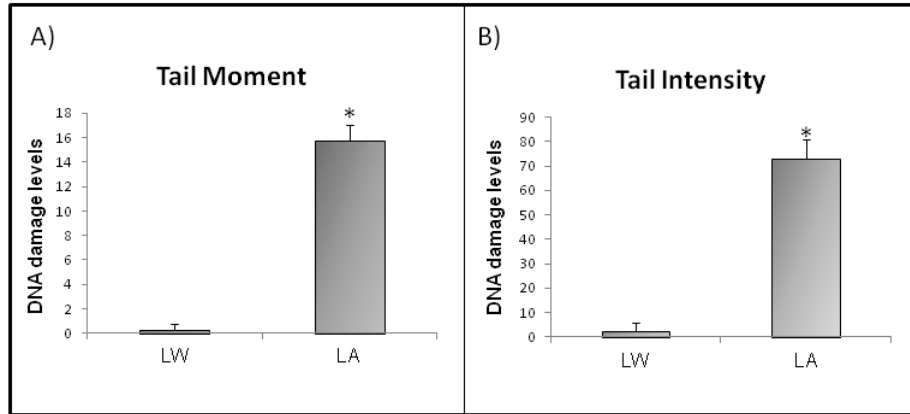


Figure 4: Effects of *H. speciosa* latex biomembrane on DNA stability. Tail moment (A) and Tail intensity (B) of DNA in fibroblast cells exposed to latex biomembrane during 72h. Bars represent the mean value from 50 cells \pm SD. P values compared with negative control. * Significance 5% ($P < 0.05$)

3.3. Angiogenesis activity

In Figure 5 images of different CAMs are shown. As can be seen, more and thicker blood vessels were formed in the three groups that used latex (LW, LA and RE) when compared with the negative control and the dexamethasone group (W and DE).

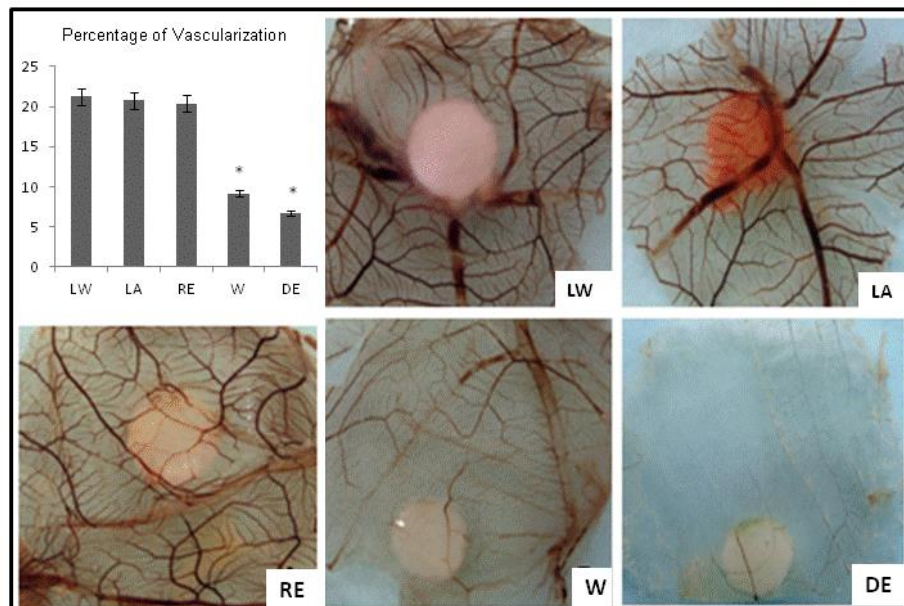


Figure 5: Images of different CAMs: LW (*H. speciosa* in water); LA (*H. speciosa* in ammonia); RE (Regederm®, positive control); W (water, negative) and DE (Dexamethasone, angiogenesis inhibitor). The vascularization as measured from image analysis is also presented for the different analyzed groups. * $P \leq 0.05$.

Figure 5 also shows the vascularization as measured from CAM image analysis. For *H. speciosa* latex eluted in water and ammonia, the vascularization percentage average was 21.23 ± 1.62 and 20.27 ± 1.35 respectively. For the positive control (Regederm®) it was 20.40 ± 3.21 ; for the negative control (water), 9.18 ± 2.27 and for dexamethasone 6.65 ± 2.37 . The *H. speciosa* latex showed a significant increase in the vascular network formed, compared to the negative control ($P < 0.05$) and the inhibitor ($P < 0.05$). No significant difference between *H. speciosa* latex and the positive control was observed. The presence of ammonia decreases the vascularization but the difference is not statistically significant.

3.4. CAM histological analysis

After CAM image analysis, the membranes were submitted to histological analysis (Figure 6). The results showed an increase in the number of blood vessels for the latex group (RE, LW and LA groups) after 72 hours of treatment, compared to the negative control and inhibitor group. The same significant difference was observed for the inflammatory response. In relation to hyperemia, the Kruskal-Wallis values were not significant ($P=0.06$). With regard to the morphological characteristics, there is no significant difference in the chorionic and allantoic epithelial layers. Thus our results indicate that *H. speciosa* latex stimulates the growth of new vessels in CAM.

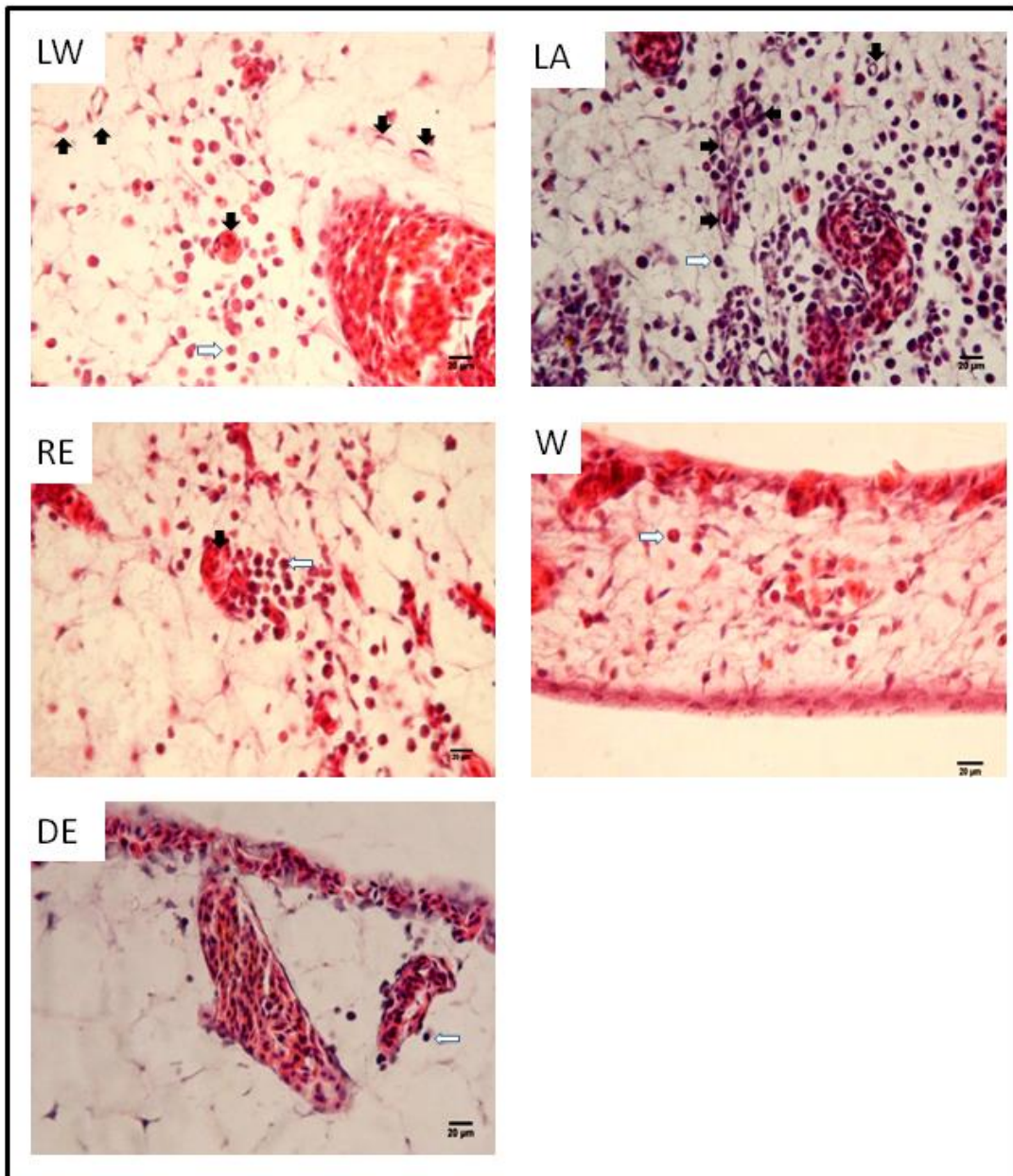


Figure 6: Paraffin sections stained with hematoxylin-eosin for different groups: LW (*H. speciosa* in water); LA (*H. speciosa* in ammonia); RE (Regederm®, positive control); W (water, negative) and DE (Dexametasona, angiogenesis inhibitor). Black arrows show revascularization, while white arrows show inflammatory elements.

4. Discussion

It is known that the applied biomaterials should possess two significant features. The first aspect is integrity and degradation of the material, which can be evaluated through their physical and chemical characterizations; and the second is the reaction of the host organism, which can be evaluated by biocompatibility and functionality tests.

In order to evaluate whether *Hancornia speciosa* latex can be used in medical applications, we first analyzed its physical and chemical characteristics. Our results showed that *H. speciosa* and *H. brasiliensis* latex do not differ significantly in their composition. In

addition, the results (CHN, TG, and FTIR) showed that the use of ammonia is unable to cause significant changes in the structure of the biomembranes (see Figure 2 (d) and Table 1). However, one can observe a slight increase in the band at 1543 cm^{-1} , which can be associated with ammonia addition during latex collection. This result found for *Hancornia speciosa* latex is very important because ammonia is a compound that is commonly used in latex manipulation as efficient bactericide and anti-clotting as well as during manufacture of natural rubber products, such as gloves, toys, balloons, catheters and condoms (Kekwich et al., 1996; Dulngali et al., 1980).

Despite research efforts, many important aspects of latex allergy have yet to be clarified. One unresolved issue concerning natural rubber allergy is the use of ammoniated or non-ammoniated latex extracts for diagnosis of allergy. In a study, La Grutta *et al.* (2003) suggested that addition of ammonia somehow alters the structure of latex components or destroys them or modifies relevant allergenic IgE epitopes, which makes the addition of low ammonia concentrations in latex less allergenic than latex without ammonia. On the other hand, Floriano *et al.*, 2003 suggested that the use of ammonia in *in vivo* tests present a negative reaction to life cells. Although our experiments are not the most suitable for allergy and bioactivity assessment, we observed that the use of ammonia as stabilizing causes a decrease of the cell viability and genotoxicity when compared with the latex stabilizing in water. In relation to angiogenesis, there are no significant differences between positive control, LA and LW groups. Taken together, our results show that for biological applications, it is better to use water than ammonia as anticoagulant in the biomembrane preparation.

With regard to biomembrane sterilization, our FTIR results showed that gamma irradiation causes slight changes on the FTIR bands at 1600 , 1448 , 1377 and 837 cm^{-1} , which can be attributed to the formation of small quantities of oxydation products (Cibulková et al., 2006). Therefore, this result suggests that irradiation does not cause significant changes in the structure of the biomembranes. Such result is also important because, in comparison with other usual methods, gamma irradiation does not need high temperatures which could degrade the latex proteins responsible for its bioactivity. It is very well documented that gamma irradiation can cause significant changes in polyisoprene films (Alam et al., 2001; Cibulková et al., 2006; and Polovková et al., 2006).

It is known that a biomaterial needs to present some bioactive components to be used in medicine. Previous studies have demonstrated that various lactiferous plants have bioactive components with angiogenic actions, such as: *Hevea brasiliensis* (Frade et al., 2012; Araujo et al., 2012) *Synadenium umbellatum* (Melo-Reis et al., 2010), *Euphorbia caducifolia* (Goyal et al., 2012) and *Carica cadamarcensis* (Mello et al., 2008). The aim of this work was to

evaluate the pharmacological potential of *Hancornia speciosa* latex. One indicative of *H. speciosa* medicinal potential is its use in folk medicine (Macedo and Ferreira, 2004; Ritter et al., 2002). Moreover, previous studies showed the anti-inflammatory effects of *Hancornia speciosa* latex (Marinho et al., 2011). Besides the pharmacological potential indicative, *H. speciosa* latex needs to be evaluated in relation to toxicity before it can be used in medicine. According ANVISA and international standards (ISO 10993-3 and 10993-5), biocompatibility testing to develop a new material includes cytotoxicity and genotoxicity assays. In this work we selected *in vitro* tests in mouse fibroblast NIH cells to confirm the biocompatibility of *H. speciosa* latex. The result we observed (Figure 3 and 4) is that latex samples eluted in water (LW) are not cytotoxic neither genotoxic.

However, it is not only the absence of a toxic effect that describes the term biocompatibility, but also the presence of a positive influence in terms of biofunctionality, e.g., the promotion of angiogenesis (Wiegand and Hipler, 2008). The CAM assay has been widely used as an *in vivo* model to study the angiogenic activity of various agents, e.g. growth factors, cytokines, hormones, drugs, tissue extracts and implanted tissue grafts (Zwadlo-Klarwasser et al., 2001). The results obtained in this study demonstrate that treatments using latex eluted in ammonia or water show a significant increase of percentage area of vascular net in fertilized chicken eggs compared to negative and inhibitor control groups.

In addition to image analysis, it is important to evaluate the tissue histology to confirm the angiogenic activity. It has already been pointed out in the literature that the inflammatory cells are important to activate factors to stimulate the angiogenic process (May et al., 2008). Inflammatory cells such as macrophages, lymphocytes, mast cells and fibroblasts are capable of stimulating vessel growth (Jackson et al., 1997; Folkman and Brem 1992). Inflammatory mediators, including PGE1, PGE2, TNF, IL-1, IL-6 and IL-8, in addition to having pro-inflammatory activities, are capable of directly and/or indirectly inducing angiogenesis *in vivo* (Remmer et al., 1991). In this way, angiogenesis and inflammation complement each other. Our histological data is in accordance with CAM images, where we obtained significant differences in the presence of inflammatory elements and neovascularization.

Another important aspect of this study is the use of different parts of *Hancornia speciosa* (leaf, bark, fruit and latex) with pharmacological interest. Some recent studies have shown the pharmacological potential of some extracts obtained from *Hancornia speciosa* species, such as anti-inflammatory effect from latex (Marinho et al., 2011), anti-bactericide from bark (Moraes et al., 2008) and hypotensive from leaves (Silva et al., 2011). Taken together, those results showed the important pharmacological potential of *H. speciosa* species

and add economic value to *H. speciosa* culture which up to now has been exclusively used for fruit production.

5. Conclusion

Our data indicate that the latex obtained from *H. speciosa* and eluted in water presents significant angiogenic activity and does not present cytotoxic and genotoxic effects on life system. The same did not occur with *H. speciosa* latex stabilized with ammonia. The ammonia addition does not cause significant effects on the structure of biomembranes, but showed a smaller cell survival and a significant genotoxicity effect. This study contributes to the understanding of the potentialities of *Hancornia speciosa* latex as sources of new phytomedicines.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Brazilian funding agencies MCT/CNPq, FNDCT, CAPES, FINEP, FAPEG, FAPESP and FUNAPEP. Revision of the English language text was carried out by Universidade Estadual de Goiás (UEG).

References

- Akasawa, A., Hsieh, L.S., Lin, Y., 1995. Serum reactivities to latex proteins (*Hevea brasiliensis*). *J. Allergy Clin. Immunol.* 95, 1196 - 1205.
- Alam, T. M., Celina, M., Assink, R. A., Clough, R. L., Gillen, K. T., 2001. ¹⁷O NMR investigation of oxidative degradation in polymers under g-irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* 60, 121 - 127.
- Araújo, M.M., Massuda, E.T., Hyppolito, M.A., 2012. Anatomical and functional evaluation of tympanoplasty using a transitory natural latex biomembrane implant from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. *Acta Cirúrgica Brasileira* 27 (8), 566-571.
- Balabanian, C.A., Coutinho-Netto, J., Lamano-Carvalho, T.L., Lacerda, S.A., Brentegani, L.G., 2006. Biocompatibility of natural latex implanted into dental alveolus of rats. *Journal of Oral Science* 48, 201-205.
- Bannerman, R.H., 1982. Traditional medicine in modern health care. *World Health Forum* 3, 8 - 13.
- Berthelot, K., Lecomte, S., Estevez, I., Couлары-Salin, B., Bentaleb, A., Cullin, C., Deffieux, A., Peruch, F., 2012. Rubber elongation Factor (REF), a major allergen component in *Hevea brasiliensis* latex has amyloid properties. *PlosOne* 7 (10), e48065.doi:10.1371/journal.pone.0048065.
- Borenfreund, E., Puerner, J., 1985. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119 - 124.

Brazilian Institute of Geography and Statistic, 2010. Sistema de Recuperação automática. <HTTP://www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 23 de maio 2010.

Carvalho, B.R., Reis, R.M., Coutinho Netto, J., Moura, M. D., Nogueira, A.A., Ferriani R.A. 2008. Natural latex (*Hevea brasiliensis*) mold for neovaginoplasty. Rev Bras.Ginecol. Obstet. 30 (1), 31-35.

Carvalho, P.C.L., Soares, W.S., Ritzinger, R., Carvalho, J.A.B.S., 2001. Conservação de fruteiras tropicais com a participação do agricultor. Revista Brasileira de Fruticultura. Jaboticabal, 23(3), 730 - 734.

Cibulková, Z., Polovková, J., Luke, V., Klein, E., J., 2006. DSC and FTIR study of the gamma radiation effect on cis-polyisoprene. J. Therm. Anal. Cal. 84, 709 - 713.

Czuppon, A.B., Chen, Z., Rennert, S., Engelke, T., Meyer, H.E., Heber, M., Baur, X., 1993. The rubber elongation factor of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) is the major allergen in latex. J. Allergy Clin. Immunol. 92, 690 - 697.

dos Santos, K.A.M., Suarez, P.A.Z., Rubim, J.C., 2005. Photo-degradation of synthetic and natural polyisoprenes at specific UV radiations. Polym. Degrad. Stab 90, 34 – 43.

Dulngali, S., Fah, C.S., 1980. Preservative system for Field latex. Kuala Lumpur: RRIM, Universiti Malaya, Malaya.

Ebo, D.G., Stevens, W.J., 2002. IgE-mediated natural rubber latex allergy: an update. Acta Clin Belg. 57, 58-70.

Ereno, C., Guimarães, S. A. C., Pasetto, S., Herculano, R. D., Silva, C. P., Graeff, C. F. O., Tavano, O., Baffa, O., Kinoshita, A., 2010. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. Journal of Biomedical Materials Research. Part A, 95A, 932 -939.

Ferreira, H.C., Serra, C.P., Lemos, V.S., Braga, F.C., Cortes, S.F., 2007a. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. Journal of Ethnopharmacology, 109, 161–164.

Ferreira, H.C., Serra, C.P., Endringer, D.C., Lemos, V.S., Braga, F.C., Cortes, S.F., 2007b. Endothelium-dependent vasodilatation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. Phytomedicine 14, 473–478.

Florianio, J. F., Mota, L. S. L. S., Furtado, E. L., Rossetto, V. J. V., Graeff, C. F. O., 2013. Biocompatibility studies of natural rubber latex from different tree clones and collection methods. Journal of Materials Science: Materials in Medicine (J. Mater. Sci: Mater. Med.) DOI 10.1007/s10856-013-5089-9.

Folkman, J., Brem, H., 1992. Angiogenesis and inflammation. In Inflammation: basic principles and clinical correlates. 2nd edition. Edited by Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R. New York: Raven; 821–839.

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

Frade, M.A., Assis, R.V., Coutinho-Netto, J., Andrade, T.A., Foss, N.T., 2012. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. *An. Bras. Dermatol.* 87(1), 45 - 51.

Goyal, M., Nagori, B.P., Sasmal D., 2012. Wound healing activity of latex of *Euphorbia caducifolia*. *Journal of Ethnopharmacology* 144 (3), 786-790.

Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine* 27 (1), 1 - 93.

Herculano, R.D., Silva, C.P., Ereno, C., Guimarães, S.A.C., Kinoshita, A., Graeff, C.F. O., 2009. Natural Rubber Latex Used as Drug Delivery System in Guided Bone Regeneration (GBR), *Materials Research* 12 (2), 253-256.

ISO 10.993-3: International standard: Biological evaluation of medical devices – part 3. Tests for cytotoxicity: *In vitro* methods ISO 10993-3, 1992.

ISO 10.993-5: International standard: Biological evaluation of medical devices – part 5. Tests for cytotoxicity: *In vitro* methods ISO 10993-5, 1992.

ISO 11.137: Review: Sterilization of health care products 2006.

Jackson, J.R., Seed, M.P., Kircher, C.H., Willoughby, D.A., Winkler, J.D., 1997. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J.* 11(6), 457 - 465.

Kekwich, R., Bhambri, S., Chabane, M.H., Autegarden, J.E., Levy, D.A., Leynadier, F., 1996. The allergenic properties of fresh and preserved *Hevea brasiliensis* latex protein preparations. *Clin. Exp. Immunol.* 337 - 342.

Konno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., Kohnok, K., 2004. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant Journal* 37, 370-378.

La Grutta, S., Mistrello, G., Varin, E., Pajno, G.B., Passalacqua, G., 2003. Comparison of ammoniated and nonammoniated extracts in children with latex allergy. *Allergy* 58, 814 - 818.

Lambert, J., Srivastava, J., Vietmayer, N., 1997. Medicinal plants – rescuing a global heritage, Technical Paper, 355, Washington DC, World Bank.

Macedo, M., Ferreira, A.R., 2004. Plantas medicinais usadas no tratamento dermatológico da Bacia do alto Paraguai, Mato Grosso. *Revista Brasileira Farmacognosia* 14, 40 - 44.

Malmonge, J.A., Camilo, E.C., Moreno, R.M.B., Mattoso, L.H.C., McMahan, C.M., 2009. Comparative study on technological properties of latex and natural rubber from *Harconia speciosa* gomes and *Hevea brasiliensis*. *Journal of Applied Polymer Science* 111, 2986 - 2991.

Marinho, D.G., Alviano, D.S., Matheus, M.E., Alviano, C.S., Fernandes, P.D., 2011. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 135, 530-537.

- Martins, R., Kinoshita, A.M.O., Carvalho, N.T.A., Guimarães, S.A.C., 2010. Comparative study of bone response guides tissue regeneration technique – macroscopic evaluation, Part 1. Full Density in Science 1(3), 224-230.
- May, A.E., Seizer, P., Gawaz, M., 2008. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 28, 5 - 10.
- Mello, V.J., Gomes M.T., Lemos, F.O, Delfino, J.L., Andrade, S.P., Lopes, M.T., Salas, D.E., 2008. The gastric ulcer protective and healing role of cystine proteins from *Carica candamarcensis*. Phytomedicine 15(4), 237-244.
- Melo-Reis, P.R., Andrade, L.S., Silva, C.B., Araújo, L.M.M., Pereira, M.S., Mrué, F., Chen-Chen, L., 2010. Angiogenic activity of *Symadenium umbellatum* Pax latex. Brazilian Journal Biology 70, 189 - 194.
- Moraes, T.M., Rodrigues, C.M., Kushima, H., Baub, T.M., Villegas, W., Pellizzon, C.H., Brito, A., Hiruma-Lima, C.A., 2008. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. Journal of Ethnopharmacology 120, 161-168.
- Mrué, F. Neoformação tecidual induzida por biomembrana de látex natural com polilisina. Aplicabilidade na neoformação esofágica e da parede abdominal. Estudo experimental em cães. 2000. 112f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2000.
- Parente, L.M.L., Andrade M.A., Brito L.A.B., Moura, V. M. B. D., Miguel, M.P., Lino-Junior, R. S., Tresvenzol, L.F.M., Paula, J.R., Paulo, N.M., 2011. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. Acta Cirúrgica Brasileira 26(1), 19 - 24.
- Polovková, J., Klein, E., Cibulková, Z., Lukes, V., 2006. FTIR study of gamma-irradiated *cis*-1,4-polyisoprene. Chem. Pap. 60 (5), 327 – 332.
- Rema, R.B., Rajendran, K., Rangunathan, M., 2012. Angiogenic efficacy of Heparin on chick chorioallantoic membrane. Vascular Cell 4(8).
- Remmers, E.F., Sano, H., Wilder, R.L., 1991. Platelet-derived growth factors and heparin binding (fibroblast) growth factors in the synovial tissue pathology of rheumatoid arthritis. Semin Arthritis Rheum 1991, 21(3):191–199.
- Ritter, M.R., Sobierajski, G.R., Schenkel E.P., Mentz L.A., 2002. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. Revista Brasileira Framacognosia 12, 51 -62.
- Sampaio, T.S., Nogueira, P.C.L., 2005. Volatile components of mangaba fruit (*Hancornia speciosa*) at three stages of maturity. Food Chem 95, 606 - 610.
- Sampaio, R.B., Mendonca, R.J., Simioni, A.R., Costa, R.A., Siqueira, R.C., Correa, V.M., Tedesco, A.C., Haddad, A., Coutinho Netto, J., Jorge, R., 2010. Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogenic-derived fraction: an experimental model. *Curr Eye Res.* 35(1), 56-62.
- Schultz, G.S., Sibbad, R.G., Falanga, V., Ayello, E.A., Dowsett, C., Harding, K., Romanelli, M., Stacey, M.C., Teot, L., Vanscheidt, W., 2003. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. Wound Repair Regen 1, S1-28.

- Shen, J.T., Falanga, V., 2003. Innovative therapies in wound healing. *Journal of cutaneous medicine and surgery* 7(3), 217 - 224.
- Silva, C.G., Braga, F.C, Lima, M.P., Pesquero, J.L, Lemos, V.S., Cortes, S.F., 2011. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 709 - 711.
- Singh, N.P., Stephens, R.E., Schneider, E.L., 1994. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage, *International Journal of Radiation Biology* 66, 23 - 28.
- Smith-Hall, C., Larsen, H.O., Pouliot, M., 2012. People, plants and health: a conceptual framework for plant consumption. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 8, 43.
- Wagner, B., Krebitz, M., Buck, D., Niggemann, B., Yeang, H.Y., Han, K.H., Scheiner, O., Breiteneder, H., 1999. Cloning, expression, and characterization of recombinant Hev b 3, a *Hevea brasiliensis* protein associated with latex allergy in patients with spina bifida. *Journal Allergy Clin Immunol* 104, 1084 -1092.
- Yagami, T., Haishima, Y., Tsuchiya, T., Tomitaka-Yagami, A., Kano, H., Matsumaga, K., 2004. Proteomic analysis of putative latex allergens. *Int. Arch of Allergy and Immunology* 135, 3 - 11.
- Yang, E.Y., Moses, H.E., 1990. Transforming Growth Factor β 1- induced changes in cell Migration, Proliferation, and Angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane. *The J Cell Biology* 111, 731 - 741.
- Zisch, A.H., Lutolf, M.P., Hubbell, J.A., 2003. Biopolymeric delivery matrices for angiogenic growth factors. *Cardiovasc. Pathol.* 12(6), 295 - 310.
- Zwadlo-Klarwasser, G., Görlitz, K., Hafemann, B., Klee, D., 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* 12 (3), 2001.
- Wiegand, C., Hipler, U.C., 2008. Methods for measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration processes. *Krankenaushygiene Interdisziplinär* 3(1), ISSN 1863-5245.