



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS  
CÂMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS –  
HENRIQUE SANTILLO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM RECURSOS NATURAIS DO  
CERRADO

PATRICIA LIMA D'ABADIA

**CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DO LÁTEX  
DE *HANCORNIA SPECIOSA* (MANGABEIRA):  
ATIVIDADE ANGIOGÊNICA, EXPRESSÃO DE  
GENES E PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA**

Anápolis  
2017

PATRICIA LIMA D'ABADIA

**CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DO LÁTEX  
DE *HANCORNIA SPECIOSA* (MANGABEIRA):  
ATIVIDADE ANGIOGÊNICA, EXPRESSÃO DE  
GENES E PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
*Stricto Sensu* em Recursos Naturais do Cerrado, da  
Universidade Estadual de Goiás para obtenção do título  
de Mestre em Recursos Naturais do Cerrado.

Orientador(a): Prof(a) Dr(a). Luciane Madureira de  
Almeida

Co-Orientadora: Prof(a). Dr(a). Elisa Flávia Luiz  
Cardoso Bailão

Anápolis

2017

D'Abadia, Patrícia Lima.

Caracterização das frações do látex de *Hancornia speciosa* (Mangabeira): atividade angiogênica, expressão de genes e prospecção fitoquímica/ Patrícia Lima D'Abadia – 2017.

64 f: figs, tabs.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Luciane Madureira de Almeida

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, Câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas, 2017.

Bibliografia.

PATRÍCIA LIMA D'ABADIA

CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES DO  
LÁTEX DE *HANCORNIA SPECIOSA*  
(MANGABEIRA): ATIVIDADE ANGIOGÊNICA,  
EXPRESSÃO DE GENES E PROSPECÇÃO  
FITOQUÍMICA

Dissertação defendida no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos  
Naturais do Cerrado da Universidade Estadual de Goiás,  
para a obtenção do grau de Mestre, aprovada em 20 de fevereiro de 2017, pela  
Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:



**Prof. Dr.<sup>a</sup> Luciane Madureira de Almeida**  
Presidente da banca  
Universidade Estadual de Goiás



**Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior**  
Membro externo  
Universidade Federal de Goiás



**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Pires de Campos Telles**  
Membro externo  
Universidade Federal de Goiás

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à Deus por ter me acompanhado durante esses 2 anos de muito aprendizado e lutas. Dou graças a Ele por ter me feito vencer cada barreira que me foi imposta, cada imprevisto, cada dificuldade. A lista de provações não foi pequena. Foram inúmeros os momentos em que pensei que não haveria solução para os problemas, porém, Deus segurou a minha mão e me fez forte para lutar e chegar até aqui. Por isso, meus maiores agradecimentos são para Ele, Jesus Cristo, o qual me capacitou e me deu forças para alcançar a minha vitória.

Em segundo, agradeço aos meus pais, que me deram todo suporte que precisei, tanto financeiro, quanto emocional, e ainda por me proporcionarem uma vida em que eu pudesse me dedicar integralmente aos estudos. Agradeço a eles por sempre comemorarem comigo cada passo que dei, desde o primeiro elogio que eu ganhei da orientadora, até o primeiro artigo publicado. Incluo aqui também, a minha grande amiga e parceira Jéssica de Oliveira, a qual me acompanhou, apoiou e comemorou comigo cada passo que dei, assim como meus pais.

Em terceiro, agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Luciane Madureira de Almeida por ter me mostrado o verdadeiro significado da palavra PESQUISADOR. Os ensinamentos que com ela aprendi, não se basearam somente em adquirir conhecimentos científicos. Foi através do nosso convívio que aprendi que um pesquisador de verdade, além de ter uma boa bagagem teórica, precisa ser HUMANO, ou seja, precisa ser amigo, parceiro, solidário, compreensivo e acima de tudo, precisa ter compaixão. E todas essas características a Profa. Luciane teve comigo, me entendendo nos meus momentos de crise, e me ajudando e me acompanhando em todas as etapas do meu crescimento profissional. Por isso, agradeço a ela por ter se tornado uma referência de profissional para mim.

Agradeço também à minha co-orientadora Profa. Dra. Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão, que não mediu esforços para me acompanhar e me ajudar na etapa final e crucial desse trabalho. Além disso, sem ela eu não teria aprendido coisas que sempre almejei aprender, como o tão sonhado RT-PCR. Agradeço também ao Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges, Prof. Dr. Ruy Lino de Souza Júnior e Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles, que através de suas colaborações enriqueceram esse trabalho e me fizeram crescer profissionalmente.

Agradeço também aos vários colegas que conviveram comigo no RENAC, em especial: Rogéria, Raquel e Renato, que compartilharam comigo grandes alegrias, mas também muitas lutas. Agradeço ainda aos professores do RENAC pelos ensinamentos e à Nina, por ter me ajudado sempre que precisei, e por ser uma pessoa nota mil. Aos demais amigos, o meu muito obrigada pelas torcidas e pensamentos positivos.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro, que possibilitou a realização desse mestrado.

**"Consagra ao SENHOR todas as tuas obras e os teus planos serão bem-sucedidos". *Provérbios 16:3.***

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>9</b>
1.1. Látex: um biomaterial de grande potencial medicinal .....	9
1.2. Látex de <i>Hevea brasilienses</i> : potencialidades e limitações .....	12
1.3. <i>Hancornia speciosa</i> Gomes: uma fonte alternativa de látex com propriedades terapêuticas .....	15
1.4. Modelo da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha .....	20
1.5. Papel das metaloproteinases no processo angiogênico .....	22
<b>2. Objetivos</b> .....	<b>23</b>
<b>3. Metodologia</b> .....	<b>24</b>
3.1. Coleta e fracionamento do látex .....	24
3.2. Drogas e reagentes .....	25
3.3. Teste da membrana corioalantóide (MCA) em ovos de galinha fertilizados.....	25
3.4. Análise histológica das membranas corioalantóides.....	27
3.5. Avaliação da expressão de genes associados à angiogênese .....	28
3.6. Prospecção fitoquímica da fração soro do látex de <i>H. speciosa</i> .....	30
3.7. Comitê de ética .....	32
<b>4. Resultados e discussão</b> .....	<b>33</b>
4.1. Atividade angiogênica das frações do látex de <i>H. speciosa</i> .....	33
4.2. Análise da expressão de genes ligados à angiogênese.....	41
4.3. Prospecção fitoquímica da fração soro .....	43
<b>5. Conclusão</b> .....	<b>49</b>
<b>6. Referências</b> .....	<b>50</b>
<b>7. Apêndices</b> .....	<b>62</b>
Apêndice A: Passo a passo Gimp e ImageJ .....	62
Apêndice B: Etapas do procedimento histológico .....	63
<b>8. Anexos</b> .....	<b>64</b>
Anexo I: Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEG) .....	64

## RESUMO

O látex de diversas plantas apresenta potencial biotecnológico para desenvolvimento de novos fármacos. Dentre as lactíferas, a mais conhecida e explorada comercialmente é a seringueira, a qual possui látex com propriedade angiogênica. A fração F1 do látex de seringueira originou o Regederm<sup>®</sup>, creme-gel utilizado no tratamento de lesões teciduais. Contudo, existem relatos sobre alergias a produtos a base do látex de seringueira. Por esse motivo, tem-se buscado outras espécies lactíferas produtoras de látex com menor potencial alergênico. A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), planta nativa do cerrado e pouco explorada comercialmente, pode ser uma alternativa, uma vez que essa planta produz um látex com menor quantidade de proteínas, biocompatível e com propriedades angiogênicas. O objetivo desse trabalho foi fracionar o látex de mangabeira e avaliar o potencial angiogênico de suas frações; visando identificar qual dessas frações tem potencial para ser utilizado como biomaterial para aplicações médicas, e também determinar quais os principais metabólitos secundários que constituem a fração angiogênica. Para avaliar o potencial angiogênico, foi realizado o ensaio utilizando membrana corioalantóide (MCA) de ovos de galinha fertilizados. Os dados obtidos a partir desta técnica foram complementados pela análise molecular da expressão de genes relacionados à remodelamento tecidual e por prospecção fitoquímica da fração responsável pela maior atividade angiogênica do látex de mangabeira. Os resultados morfométricos obtidos pelo ensaio da MCA demonstraram um aumento significativo da rede vascular nas membranas tratadas com as frações soro e F1 do látex de mangabeira, quando comparadas ao controle neutro e controle inibidor. Além da avaliação morfológica das MCAs, foram realizadas também análises histológicas as quais identificaram maior intensidade de inflamação, células do conjuntivo e angiogênese nas MCAs submetidas às frações soro e F1 do látex de mangabeira, confirmando os dados morfométricos e sugerindo a atividade regenerativa do látex de mangabeira. As análises moleculares mostraram uma expressão aumentada do gene da metaloprotease 2, associado a angiogênese, nas MCAs tratadas com a fração F1 do látex de mangabeira. Assim, de forma geral, os dados obtidos no presente estudo revelaram que a fração soro do látex de mangabeira representa um importante agente angiogênico e que este biomaterial possui potencial terapêutico para ser explorado pelas ciências médicas. A prospecção química da fração soro, responsável pela maior atividade angiogênica, revelou a presença de flavonóides e taninos. Dados da literatura destacam a importância farmacológica desses compostos por serem substâncias que possuem atividade antioxidante, antimicrobiana e de forte potencial angiogênico, sendo capazes de atuar na aceleração do processo de regeneração tecidual. A utilização do soro do látex de mangabeira como um biomaterial em aplicações médicas, representa uma área bastante promissora, em especial, devido a sua capacidade de estimulação natural da angiogênese e por apresentar biocompatibilidade com sistemas vivos. Esses resultados agregam valor econômico a *H. speciosa*, a qual até o presente momento, vem sendo explorada comercialmente apenas pela utilização de seus frutos pela indústria alimentícia.

Palavras-chave: Angiogênese, Flavonóides, Membrana corioalantóide, Plantas do Cerrado, Taninos.



## ABSTRACT

The latex of several plants presents biotechnological potential for the development of new drugs. Among the lactiferous, the best known and commercially explored is the rubber tree, which has latex with angiogenic properties. The F1 fraction of natural rubber latex originated Regederm®, cream-gel used in the treatment of tissue lesions. However, there are reports of allergies to products based on natural rubber latex. For this reason, researchers have been looking for other latex producing lactiferous species with less allergenic potential. The mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), a plant native to the Cerrado and poorly explored commercially, may be an alternative, since this plant produces a latex with less amount of proteins, biocompatible and with angiogenic properties. The objective of this work was to fractionate the mangabeira latex and to evaluate the angiogenic potential of its fractions; aiming to identify which of these fractions has the potential to be used as biomaterial for medical applications, and also to determine the main secondary metabolites that constitute the angiogenic fraction. To evaluate the angiogenic potential, the chorioallantoic membrane (CAM) assay was performed on fertilized chicken eggs. The data obtained from this technique were complemented by quantitative real-time PCR of genes related to tissue remodeling and by phytochemical prospection of the fraction responsible for the highest angiogenic activity of mangabeira latex. The morphometric results, obtained by the CAM assay, showed a significant increase of the vascular network in the membranes treated with the serum and F1 fractions of the mangabeira latex when compared to the neutral control and control inhibitor. In addition to the morphological evaluation of the CAMs, histological analysis were also performed, which identified a higher intensity of inflammation, conjunctival cells and angiogenesis in the CAMs submitted to the serum and F1 fractions of the mangabeira latex, confirming the morphometric data and suggesting the regenerative activity of mangabeira latex. Molecular analysis showed increased expression of the metalloprotease 2 gene, associated with angiogenesis, in CAMs treated with F1 fraction of mangabeira latex. Thus, in general, the data obtained in the present study shows that the serum fraction of mangabeira latex represents an important angiogenic agent and that this biomaterial has therapeutic potential to be explored by the medical sciences. The chemical prospection of the serum fraction, responsible for the highest angiogenic activity, showed the presence of flavonoids and tannins. Literature data highlight the pharmacological importance of these compounds to be substances that have antioxidant, antimicrobial and strong angiogenic potential, being able to act in the acceleration of the tissue regeneration process. The use of the mangabeira latex serum as a biomaterial in medical applications represents a very promising area, in particular due to its ability to naturally stimulate angiogenesis and to present biocompatibility with living systems. These results add economic value to *H. speciosa*, which until the present moment has been commercially explored only by the use of its fruits by the food industry.

**Keywords:** Angiogenesis, Cerrado plants, Chorioallantoic membrane, Flavonoids, Tannins.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Látex: um biomaterial de grande potencial medicinal

A utilização de recursos naturais para fins terapêuticos vem ocorrendo desde o surgimento e consolidação das civilizações humanas, de tal maneira que esses produtos naturais, sejam eles de origem mineral, vegetal ou animal, tornaram-se fundamentais para manutenção e melhoria da qualidade de vida humana (RODRIGUES; AMARAL, 2012). A Organização Mundial de Saúde estima que cerca de dois bilhões de pessoas no mundo utilizam-se da medicina popular baseada na extração de princípios ativos das plantas, para o tratamento de doenças (SMITH-HALL et al., 2012). Em 2003, estimava-se que cerca de 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica eram desenvolvidos a partir de fontes naturais, sendo 25% de plantas, 13% de micro-organismos e 3% de animais (CALIXTO, 2003). Em 2011, esse valor cresceu para cerca de 50% (SACCARO JÚNIOR, 2011). Entretanto, embora milhares de espécies vegetais possuam valor terapêutico comprovado e sejam frequentemente empregadas na medicina tradicional, acredita-se que apenas 1% delas seja cientificamente conhecida (YUNES; CALIXTO, 2001).

Um produto vegetal que tem despertado interesse e já é comumente empregado para o tratamento de inúmeras enfermidades é o látex de algumas plantas. Estimativas indicam que existem mais de 20.000 espécies produtoras de látex, distribuídas entre 40 famílias de plantas angiospermas. Se considerarmos também o grupo das gimnospermas e plantas que exudam resinas, esse número aumenta para 35.000 espécies (FARRELL et al., 1991). No entanto, mesmo diante de tanta diversidade, o potencial farmacológico do látex permanece praticamente desconhecido (ALMEIDA et al., 2016).

O látex é formado por uma emulsão aquosa constituída por vários tipos de componentes, como: alcalóides, terpenóides, amido, açúcares, óleo, taninos, resinas, borracha, proteínas e enzimas, tais como as proteases, quitinases e glicosidases (DOMSALLA; MELZIG, 2008; KONNO, 2011). Na grande parte das plantas lactíferas, o látex tem coloração branca, porém, pode ser encontrado também na cor amarela, alaranjada e rosada, sendo que sua composição tende a variar com a origem, anatomia e distribuição da planta (DOMSALLA; MELZIG, 2008). Algumas das principais funções do látex são defesa contra herbívoros e patógenos, excreção de metabólitos residuais e cobertura de tecido danificado (KONNO, 2011).

Nos últimos anos, o potencial medicinal do látex tem sido demonstrado por meio de estudos científicos. Dentre esses estudos pode-se destacar os que descrevem os potenciais antifúngico (RAMOS et al., 2015), antiviral (NOTHIAS-SCAGLIA et al., 2015), antioxidante (CHAUDHARY et al., 2015), antimicrobiano (RAULF, 2014), angiogênico (ALMEIDA et al., 2014), antigenotóxico (REBOUÇAS et al., 2012), anticancerígeno (MOUSINHO et al., 2011), anti-inflamatório (FERNANDEZ-ARCHE et al., 2010), antiúlcera (BHARTI et al., 2010), inseticida (RAMOS et al., 2010), antinociceptivo (SOARES et al., 2005) e analgésico (DEWAN et al., 2000) do látex. Porém, apesar de comprovado o enorme potencial farmacológico desse produto vegetal, estima-se que menos de 1% das espécies lactíferas foram investigadas quanto a sua ação medicinal, o que pode representar um atraso na descoberta de compostos para produção de novas drogas e terapias (ALMEIDA et al., 2016).

Recentemente, o látex começou a ser aplicado na medicina como constituinte de biomateriais para uso terapêutico. Existem várias definições válidas para biomateriais, uma delas criada na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde de 1982, define que estes materiais são representados por qualquer substância (exceto medicamentos) ou combinações de compostos sintéticos ou naturais, que podem ser utilizados como uma parte ou como um todo de um sistema vivo para tratar, aumentar ou substituir um tecido, órgão ou função do organismo, durante um período de tempo indeterminado (PARIDA et al., 2012; PATEL; GOHIL, 2012).

A biocompatibilidade é um dos principais pré-requisitos que um biomaterial precisa possuir para que seja considerado um dispositivo médico seguro para o tratamento de partes ou funções do corpo, que foram alteradas por doenças ou traumas. O conceito de biocompatibilidade tem mudado recentemente e deixando de ser visto como algo que “não deve fazer mal”, para algo que será utilizado para “fazer o bem”. Ou seja, um material biocompatível deixa de ser somente aquele que não gera respostas tóxicas, mutagênicas, alergênicas e inflamatórias, e passa a ser também aquele que agirá promovendo a cura do tecido ou órgão em que é implantado (HELMUS et al., 2008), isso é definido como biofuncionalidade. Nesse sentido, materiais biofuncionais são aqueles que interagem de forma benéfica com o organismo, e que por meio de suas características biofísicas, bioquímicas e biológicas irão estimular o mecanismo inato de reparo do hospedeiro, ocasionando desta forma, a regeneração funcional do tecido/órgão alvo (ZEUGOLIS; PANDIT, 2015). Dentre as biofuncionalidades de um biomaterial, pode-se citar a ação angiogênica ou antiangiogênica nos tecidos vivos.

A angiogênese é um fenômeno biológico complexo caracterizado pela formação de

novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente, na qual ocorre a proliferação, migração, regulação e diferenciação de células vasculares (FOLKMAN, 2003a). É um processo fundamental para o desenvolvimento de organismos vivos, pois atua no crescimento de órgãos e na reprodução e reparação de feridas. A angiogênese pode ocorrer de forma regulada, alcançando seu objetivo fisiológico em um determinado espaço de tempo ou pode ocorrer de forma desregulada, a qual está associada ao desenvolvimento de doenças como câncer e artrite (FERREIRA et al., 2009). O mecanismo de regulação desse processo envolve moléculas denominadas fatores de crescimento, as quais atuam na angiogênese desencadeando a proliferação de células endoteliais (FOLKMAN; SHING, 1992).

O processo de angiogênese vem sendo foco de investigações científicas em pesquisas sobre câncer, cicatrização de feridas e na engenharia de tecidos (FOLKMAN, 2003b). Na área da engenharia de tecidos, destaca-se o desenvolvimento de materiais bioativos formados por uma matriz de revestimento que contém fatores de crescimento angiogênicos e que podem aumentar a proliferação de células ou promover a cura de feridas (SHEN; FALANGA, 2003). Um exemplo de biomaterial com atividade angiogênica é o látex extraído de seringueira. Estudos recentes tem mostrado que biomembranas produzidas com látex de borracha natural, além de serem biocompatíveis, são capazes de estimular a angiogênese, adesão celular e formação de matriz extracelular (FRADE et al., 2012; FLORIANO et al., 2013). Mrué (2000) foi pioneiro no uso do látex para aplicações médicas, demonstrando que biomembranas de látex de seringueira tiveram a capacidade de induzir a cura de feridas na parede esofágica de cães ao gerar um aumento na vascularização do tecido, caracterizando assim, o seu potencial angiogênico.

O mecanismo de formação de novos vasos a partir de células endoteliais representa o processo de angiogênese fisiológica, um evento biológico essencial para o desenvolvimento de órgãos, cicatrização de feridas e respostas inflamatórias. No entanto, a formação de novos vasos também pode estar associada a doenças como artrite, cegueira, doenças infecciosas, asma e câncer, características estas, que estão presentes na angiogênese tumoral (CARMELIET, 2003). Na angiogênese tumoral observa-se que o desenvolvimento da massa tumoral está intimamente relacionado com a neovascularização, pois, as células tumorais geram fatores estimuladores da angiogênese, a fim de garantir o suprimento de oxigênio e de nutrientes para o tumor. Além disso, o surgimento de metástases tumorais se dá devido à formação de novos vasos que possibilitam a penetração de células neoplásicas nos capilares, gerando assim, a disseminação das mesmas por todo o organismo (BISCARO, 2011).

Judah Folkman foi o primeiro pesquisador a propor, em 1971, o controle do

crescimento de tumores e de metástases tumorais por meio da inibição do processo de angiogênese (FOLKMAN, 1971). Tal descoberta levou à associação de terapias quimioterápicas com compostos antiangiogênicos. Assim, um foco atual nas pesquisas sobre o tratamento de câncer, é a inibição do desenvolvimento de novos vasos necessários para a nutrição dos tumores, usando agentes antiangiogênicos (SALEEM et al., 2015). Nesse sentido, estudos têm mostrado que o látex de algumas plantas possuem atividade antiproliferativa e, conseqüentemente poderiam ser empregados em terapias anticancerígenas. Dentre as espécies lactíferas que demonstram possuir potencial antiangiogênico, destacam-se: *Euphorbia helioscopia* (SALEEM et al., 2015), *Ficus carica* (MOSTAFAIE et al., 2011), *Calotropis procera* (OLIVEIRA et al., 2010) e *Synadenium umbellatum* (NOGUEIRA et al., 2008).

## **1.2. Látex de *Hevea brasilienses*: potencialidades e limitações**

Dentre as plantas produtoras de látex, a mais conhecida e explorada comercialmente é a seringueira (*Hevea brasilienses*), uma planta originária da Amazônia brasileira, porém que vem sendo cultivada principalmente no sudeste Asiático (YEANG et al., 2002). O látex de seringueira tornou-se a maior fonte comercial de borracha natural por possuir excelente qualidade, devido alta elasticidade, flexibilidade e resiliência, alto conteúdo de borracha e elevada capacidade de produção, destacando-se em relação ao látex das demais espécies lactíferas (MALMONGE et al., 2009). Nos últimos 50 anos, diferentes produtos derivados desse látex vem sendo comercializados em grande escala, a exemplo disso, destacam-se os pneus, bicos de mamadeiras, luvas, fios elásticos, preservativos, travesseiros, adesivos, entre outros (FERREIRA et al., 2009). Além do uso da borracha pela indústria pneumática, propriedades medicinais estão sendo associadas ao látex de seringueira.

De acordo com a literatura, o látex de seringueira possui propriedades indutoras de regeneração tecidual, as quais foram constatadas em diferentes estudos, tais como: cicatrização de feridas em tecidos cutâneos (FRADE et al., 2012), restituição de membrana timpânica (ARAUJO et al., 2012), regeneração de ossos (HERCULANO et al., 2009; ERENO et al., 2010; MARTINS et al., 2010), restituição da retina de coelho (SAMPAIO et al., 2010), neovaginoplastia (CARVALHO et al., 2008) e substituição de alvéolo dental de ratos (BALABANIAN et al., 2006). Frente ao potencial angiogênico desse látex, em 2004 foi criada uma biomembrana na forma de bandagem, chamada Biocure<sup>®</sup>. Esse produto foi patenteado e deu origem a empresa Pelenova, a qual explora e utiliza as propriedades e

produtos originados do látex de seringueira. Atualmente, o Biocure<sup>®</sup> teve sua fabricação descontinuada e foi substituído por outra formulação em creme-gel, chamada de Regederm<sup>®</sup>, o qual é utilizado para recomposição cutânea e indicado no tratamento e cicatrização de feridas cutâneas, garantindo melhora em apenas dez dias (PELENOVA, 2016).

A cicatrização de feridas e a revascularização de tecidos são fenômenos que dependem de eventos que levem ao aumento de permeabilidade dos vasos e angiogênese. Por meio do aumento da permeabilidade vascular, moléculas como citocinas e fatores de crescimento conseguem alcançar o tecido ferido e por meio da angiogênese esse tecido é nutrido (BATES; HARPER, 2002; MENDONÇA et al., 2010). Graças ao comprovado potencial angiogênico do látex de seringueira, a ocorrência desses eventos é estimulada em tecidos tratados com esse composto. O potencial regenerativo do látex de borracha natural foi testado por Mendonça et al. (2010), o qual isolou as frações do látex de seringueira, separando as frações de soro e de borracha, e observou, por meio do ensaio em membrana corioalantóide (MCA) de embrião de galinha, que a fração soro mostrou ter efeito angiogênico. Em adição a isso, realizou também um ensaio em úlcera dérmica de orelha de coelho e constatou que essa mesma fração foi capaz de acelerar a cicatrização das feridas.

Em relação a sua composição, o látex de *H. brasilienses*, quando centrifugado, apresenta três principais frações: a fase da borracha, o soro C e a fração de fundo (Figura 1). A fase da borracha é composta por centenas de moléculas de hidrocarboneto envolvidas por uma camada de proteínas e de fosfolípídeos, o que confere carga negativa a essa fração e consequente estabilidade coloidal das partículas. Já o soro C representa o meio aquoso no qual estão suspensas todas as organelas de látex e é nessa fração que se encontra uma gama de proteínas relacionadas com o metabolismo celular, a exemplo disso, tem-se todas as enzimas da via respiratória e proteínas específicas como as enzimas utilizadas na biossíntese da borracha. Portanto, observa-se que as proteínas dessa fração são mais numerosas em comparação com as demais frações (Tabela 1). Além de proteínas, encontra-se no soro C outros compostos como: íons, carboidratos, aminoácidos e outras substâncias solúveis. A fração de fundo, por sua vez, possui principalmente os compostos lutóides (que formam o soro B) e outras organelas menores, como os ribossomos e retículo endoplasmático. Os compostos lutóides são organelas ricas em soro catiônico, responsáveis pela coagulação do látex e pela ocorrência de eventos bioquímicos como controle do pH e defesa contra patógenos. Esses lutóides são constituídos por cátions como cálcio, magnésio, potássio, cobre e proteínas catiônicas (YEANG et al., 2002; AGOSTINI, 2009; RAULF, 2014).

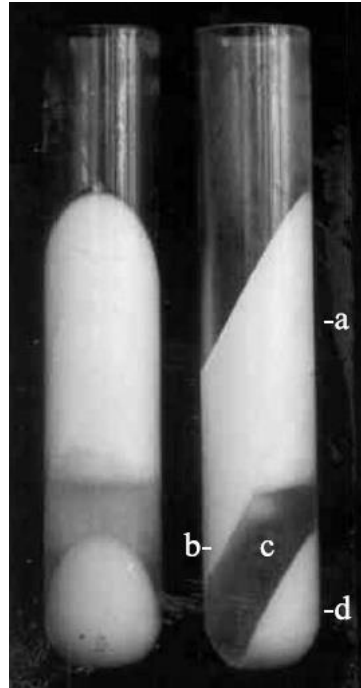


Figura 1. Frações do látex de *H. brasilienses*. O látex foi centrifugado em alta velocidade (44.000 g durante 1 h), posteriormente apresentou três principais frações: a fração de borracha (a,b), composta por partículas grandes de borracha (a) e a zona de Moir's 2 com partículas pequenas de borracha; o soro C (c) e a fração de fundo, que compreende principalmente os compostos lutóides, os quais são fonte do soro B (d). FONTE: Yeang et al., (2002).

Tabela 1: Distribuição proteica das frações de látex de *H. brasilienses* centrifugado.

Fração do Látex	Concentração de proteína (mg/mL látex)	%
<b>Borracha</b>	3.5	25
<b>Soro C</b>	6.0	43
<b>Soro B</b>	3.6	26
<b>Fração de fundo</b>	0.9	6
<b>TOTAL</b>	14.0	100

Fonte: Adaptada de Yeang et al., (2002).

Ferreira et al. (2009) realizaram o fracionamento do látex de seringueira, separando a fração soro (todos os compostos de não-borracha do látex) da fração de borracha e avaliando o potencial angiogênico dessas frações usando o ensaio com membranas corioalantóides de galinha. Como resultado, os autores observaram que o látex bruto e a fração soro apresentaram atividade angiogênica, sugerindo assim, que a fração de borracha não deve possuir atividade angiogênica e que esse papel deve ser desempenhado pelo soro do látex.

Esse potencial angiogênico do soro foi visto também no estudo de Sampaio et al. (2010), o qual verificou que, ao injetar microesferas contendo soro de látex de seringueira na cavidade vítrea de coelhos, ocorreu indução de neovascularização de suas retinas.

Apesar dos expressivos resultados obtidos no uso medicinal e comercial do látex de seringueira, existem muitos relatos sobre alergias a produtos a base desse látex (RAULF, 2014). A ocorrência de alergia ao látex passou a ser relatada como um problema grave de saúde no final de 1980 e tem prevalência maior em grupos como os de profissionais da área da saúde, trabalhadores da indústria de borracha, pacientes submetidos a múltiplas cirurgias e crianças com espinha bífida (GAWCHIK, 2011; RAULF, 2014). Embora a incidência dessa alergia tenha diminuído nos últimos anos nos Estados Unidos, cerca de 15 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de alergia a esse composto (KAHN et al., 2016). Essa reação alérgica se dá pelo contato direto da pele, mucosas e trato respiratório com os compostos alergênicos presentes no látex (GAWCHIK, 2011).

O látex de borracha natural possui 15 proteínas comprovadamente alergênicas (Hevb1 a Hevb15) capazes de provocar respostas de hipersensibilidade imune na população alérgica e em casos mais extremos podendo levar até a morte, em quadros de anafilaxia (WU et al., 2016). Essas 15 proteínas foram registradas pelo Comitê Internacional de Nomenclatura de Alérgenos ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)), sendo que Hevb1, 2, 3, 4, 5, 6, 6.01, 6.02, 7.01, 13 e 14 foram consideradas como os alérgenos do látex de *H. brasilienses* com maior poder de sensibilização. Os demais compostos ainda estão sendo explorados. Estudos realizados recentemente indicam que diferentes compostos alergênicos do látex, podem sensibilizar diferentes grupos de indivíduos que possuem alergia a esse composto (KAHN et al., 2016). Hevb1 e 3 provocaram reações principalmente em pacientes com espinha bífida (YEANG et al., 1996), Hevb2 e 4 em trabalhadores da saúde (SUNDERASAN et al., 1995), Hevb5 em profissionais da saúde e crianças (SLATER et al., 1996) e Hevb7 em adultos (SEPPÄLÄ et al., 2000).

### **1.3. *Hancornia speciosa* Gomes: uma fonte alternativa de látex com propriedades terapêuticas**

A grande incidência de alergia ao látex de seringueira representa um dos principais motivos para se buscar outras espécies lactíferas produtoras de látex com menor potencial alergênico. A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes), planta nativa do cerrado e pouco explorada comercialmente, pode ser uma alternativa para extração de látex para utilização



biomédica. Uma das vantagens do uso da mangabeira é a possibilidade de esta planta produzir um látex hipoalergênico, biocompatível, com propriedades angiogênicas e não tóxico (MALMONGE et al., 2009; MARINHO et al., 2011; ALMEIDA et al., 2014). Malmonge et al. (2009) ao comparar a quantidade de nitrogênio (N) do látex de seringueira com o de mangabeira, sendo a porcentagem de N um índice utilizado para estimar o conteúdo proteico de amostras, observou que a carga proteica do látex de mangabeira é menor do que o de seringueira, o que sugere que o látex de *H. speciosa* pode possuir menor potencial alergênico do que o de *H. brasilienses*.

*H. speciosa* é uma planta frutífera típica de clima tropical, nativa do Brasil e tem ampla distribuição por todo o país (Figura 2), sendo encontrada principalmente na região que compreende os Tabuleiros Costeiros e a Baixada litorânea do Nordeste até os Cerrados das regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste (SILVA JUNIOR, 2004). O Cerrado, local de ampla distribuição da mangabeira, é um bioma detentor de uma enorme diversidade vegetal e ocupa cerca de 24% do território brasileiro. É um bioma composto por um mosaico de vegetação natural que inclui formações florestais, savânicas e campestres. Essa diversidade de paisagens é fator determinante em sua rica diversidade florística e faunística. Atualmente, a biodiversidade do Cerrado vem sendo perdida predatoriamente devido conversões de suas áreas naturais em áreas agrícolas e pastagens (SAWYER, 2008; SILVA, 2013).



Figura 2: Mapa de ocorrência da mangabeira (*H. speciosa* Gomes) no Brasil. Fonte: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/>.

O Cerrado possui uma enorme variedade de espécies frutíferas, as quais são exploradas desde os primórdios pelas populações indígenas que buscavam frutas para complementar suas dietas alimentares. Tais frutas são indispensáveis na dieta humana, devido ao seu alto conteúdo de vitaminas e sais minerais (SILVA, 2013). Além de valor nutricional, as frutas do Cerrado são atrativas devido sua cor, sabor e aromas peculiares. Junquiera et al. (2012) relata que dentre as frutíferas do Cerrado, a mangabeira representa uma das espécies mais procuradas em toda a região, ficando atrás somente do pequi (*Caryocar brasiliense*). O fruto da mangabeira, mangaba, é consumido maduro e a polpa e a casca são consumidas “*in natura*” na forma de sorvetes, geléia, sucos, doces, vinhos e licores (VIEIRA et al., 2006). Entretanto, a única forma de exploração da mangabeira atualmente é o extrativismo, o que representa uma perda do grande potencial da espécie, impossibilitando o aproveitamento de todas as suas propriedades (ROSA et al., 2005). Além disso, a perda de habitat adequado para *H. speciosa*, que vem ocorrendo devido às alterações climáticas globais, representa um outro

fator que irá limitar a disponibilidade da mangabeira e de todo seu potencial medicinal. Esse fato irá afetar os municípios que utilizam essa espécie de forma sustentável, o que causará um grande impacto sobre a economia local (NABOUT et al., 2016).

A mangabeira (Figura 3) pertence à classe Eudicotiledoneas, ordem Gentianales, família Apocynaceae e gênero *Hancornia* (CERCATO, 2015). É uma frutífera lactífera de porte médio que possui copa irregular; tronco tortuoso, ramificado e áspero; ramos lisos e avermelhados; raiz pivotante; folhas simples, opostas, ovais ou lanceoladas, pecioladas e coriáceas. Suas inflorescências se encontram no ápice dos ramos e suas flores são brancas e hermafroditas (LEDERMAN et al., 2000). Os frutos, por sua vez, são do tipo baga e possuem tamanho, formato e cores variados, podendo ter forma elipsoide ou arredondada, com coloração amarela ou esverdeada, com ou sem pigmentação vermelha (VIEIRA et al., 2006). O interesse no fruto da mangabeira vem crescendo e tem despertado o investimento comercial na cultura dessa planta (SOUZA, 2001). No entanto, além dos frutos, outros importantes subprodutos com potencial farmacológico podem ser extraídos dessa planta.

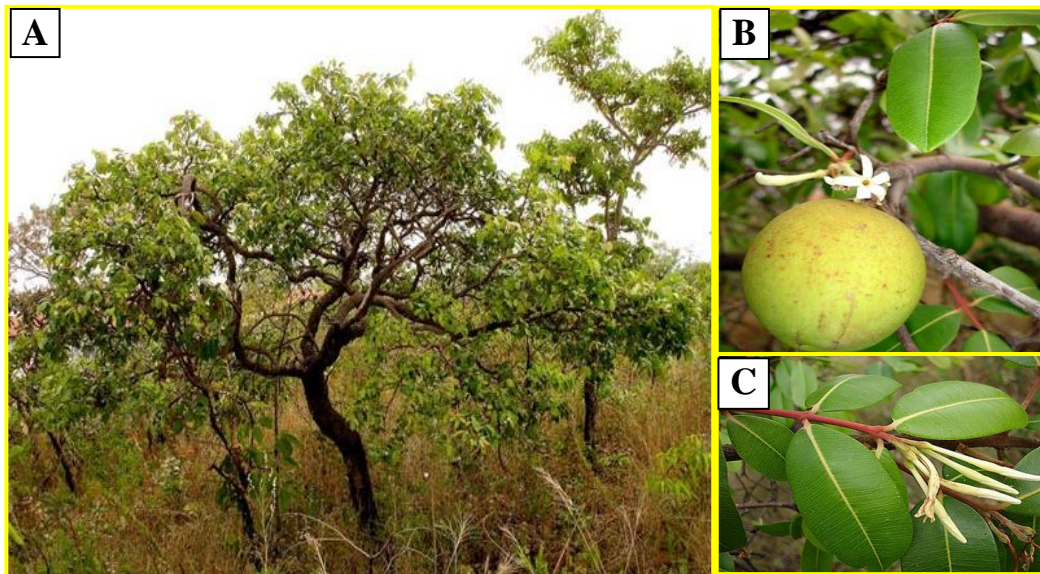


Figura 3: Árvore de *H. speciosa* Gomes (A), seus frutos, flores e folhas (B e C). Fonte: <https://www.google.com.br/imghp?hl=pt-PT>.

Na medicina popular, *H. speciosa* é utilizada em diferentes tratamentos de enfermidades. A casca dessa planta tem sido usada para tratar dermatoses e doenças que atingem o fígado, além de serem indicadas para tratamentos anti-inflamatórios e para combate de diabetes e perda de peso. Já as raízes da mangabeira são utilizadas no tratamento de luxações, reumatismo e são receitadas para o uso como medicamento antigástrico e anti-hipertensivo. O látex e folhas, por sua vez, são usados como adstringente para tratar sintomas

de cólicas menstruais, dermatoses, tuberculose, úlceras, herpes, verrugas e também doenças no fígado (GRANDI et al., 1989; RODRIGUES; CARVALHO, 2001; SILVA et al., 2010; CERCATO, 2015).

De acordo com pesquisas científicas, as folhas de *H. speciosa* podem ser utilizadas para extração de substâncias ativas usadas para controle da pressão arterial (FERREIRA et al., 2007 a,b; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2016), tratamento de feridas e doenças inflamatórias (GELLER et al., 2015) e tratamento de diabetes mellitus (PEREIRA et al., 2015). Extratos da casca de mangabeira possuem substâncias eficazes no combate e cura de úlceras gástricas causadas por *Helicobacter pylori* (MORAES et al., 2008). Já o seu látex apresentou atividade anti-inflamatória em ratos (MARINHO et al., 2011), atividade angiogênica em ovos de galinha (ALMEIDA et al., 2014), e atividade osteogênica na calvária de ratos (NEVES et al., 2016) e coelhos (FLORIANO et al., 2016). Além disso, Costa et al. (2008) identificou o potencial antimicrobiano do extrato etanólico da mangabeira e Endringer et al. (2010) observou que essa planta possui agentes promissores que atuam na quimioprevenção de câncer.

Almeida et al. (2014) avaliaram a biocompatibilidade e as propriedades angiogênicas do látex de *H. speciosa* G e a sua potencial aplicação medicinal. Ao realizarem uma caracterização físico-química por meio de métodos de análise elementar – CHN, análise termogravimétrica e espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier (FTIR), observaram que a estrutura de biomembranas a base de látex de mangabeira é muito semelhante ao de seringueira. No entanto, estudos sistemáticos que investiguem as propriedades físicas e químicas do látex de mangaba são poucos e necessitam ser mais explorados (MALMONGE et al., 2009). Os ensaios de biocompatibilidade, por sua vez, foram feitos por meio de testes de citotoxicidade e genotoxicidade em células de fibroblastos de ratos e demonstraram que o látex de *H. speciosa* diluído em água não apresentou efeitos citotóxicos e genotóxicos, portanto, biocompatível com sistemas vivos.

As propriedades angiogênicas do látex de mangabeira, analisadas por Almeida et al. (2014), foram avaliadas no teste da MCA de ovo embrionado de galinha. Mediante os resultados obtidos nesse ensaio, constatou-se a eficiência do látex em aumentar a neovascularização de tecidos vivos. Análises histológicas também foram realizadas nos tecidos tratados com o látex, os quais foram avaliados quanto à presença de elementos inflamatórios e de novos vasos, uma vez que, esses elementos são capazes de estimular o crescimento de vasos e induzir a angiogênese (JACKSON et al., 1997). A partir das análises histológicas, foi confirmada a atividade angiogênica observada anteriormente no teste MCA.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram, portanto, que o látex de *H. speciosa* diluído em água não possui efeitos tóxicos em sistemas vivos e apresenta uma significativa atividade angiogênica, configurando-o assim, como um bom biomaterial para aplicações médicas.

#### 1.4. Modelo da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha

O modelo biológico escolhido para avaliar o potencial angiogênico das frações do látex de mangabeira foi o ensaio da MCA em ovos de galinha fertilizados. A MCA é um órgão respiratório transitório do embrião de galinha, e fica localizada logo abaixo da casca do ovo. Sua estrutura é composta por um estroma mesodérmico revestido exteriormente por uma camada ectodérmica e interiormente por uma camada endodérmica, representadas pelo epitélio coriônico e alantoide, respectivamente, como mostra a Figura 4 (SAMKOE; CRAMB, 2003). Além disso, a MCA possui proteínas da matriz extracelular, tais como: fibronectina, laminina, colágeno tipo I, integrina  $\alpha\beta_3$  e metaloproteinase 2 (GIANNOPOULOU et al., 2001). É um tecido que possui um sistema vascular bastante regular, sendo percebida uma densa vascularização desde o quarto dia do desenvolvimento embrionário (WILTING et al., 1991).

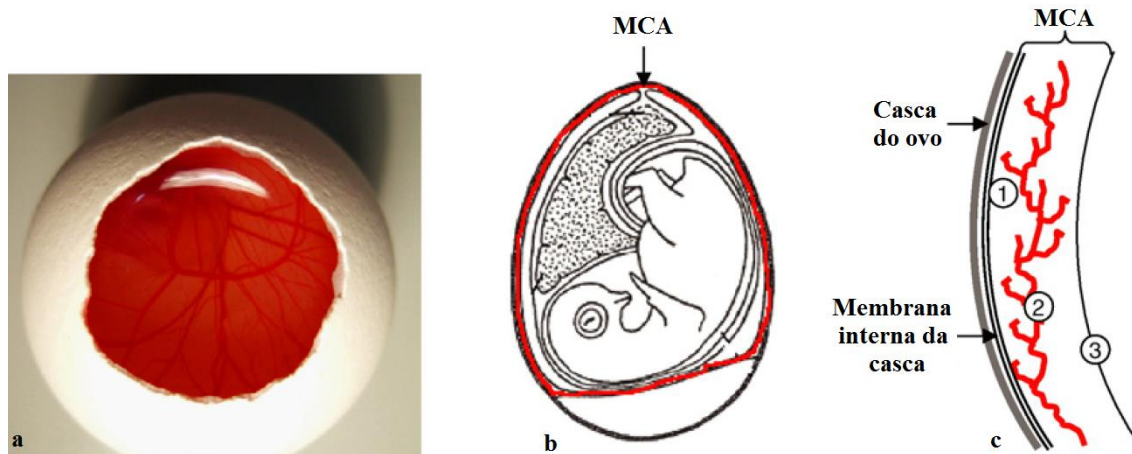


Figura 4: Localização e estrutura da membrana corioalantóide. Membrana corioalantóide de embrião de galinha (a); localização da MCA ao redor do embrião e em contato direto com a casca do ovo (b); organização da membrana corioalantóide, onde 1 representa o epitélio coriônico, 2 o mesoderma altamente vascularizado e 3 o epitélio alantoide (c). Adaptado de: VARGAS et al., 2007.

O ensaio da MCA consiste basicamente em se fazer uma abertura na casca do ovo que permite acessar e visualizar facilmente a MCA e posteriormente, adicionar a essa membrana embrionária a droga, fator ou implante que se deseja testar. A seguir a abertura é fechada com fita adesiva, preferencialmente transparente, para que se possa visualizar o local de teste.

Após 1 a 3 dias de contato da substância testada com a membrana, pode-se avaliar o efeito angiogênico, antiangiogênico ou de toxicidade do tratamento ministrado (WILTING et al., 1991; VALDES et al., 2002). A análise de resposta angiogênica no ensaio MCA ocorre 72 – 96 h após o tratamento teste ser aplicado, podendo ser observado o aumento na densidade de vasos que circundam o material inserido na membrana. Já no caso de compostos antiangiogênicos, pode ser observada a diminuição da densidade, ou mesmo o desaparecimento dos vasos (RIBATTI, 2016).

A MCA possui uma rede capilar bastante densa e por isso é comumente utilizada em estudos *in vivo* que investigam a formação de novos vasos (angiogênese) ou a inibição de neovascularização (antiangiogênese) em resposta a diferentes fatores ou biomateriais. O interesse em ensaios com embriões de galinha tem aumentado na comunidade científica por serem modelos simples, acessíveis e de baixo custo, quando comparados a ensaios desenvolvidos em mamíferos (PARENTE et al., 2011; HONDA et al., 2015). Além disso, é um teste que possui alta reprodutibilidade, confiabilidade, elevada taxa de sobrevivência de embriões (RIBATTI, 2012) e por ser um sistema fechado, possibilita que a meia-vida de diversas moléculas experimentais seja mais longa, e permite também a observação contínua do local de teste sem interromper o ensaio (VALDES et al., 2002; LOKMAN et al., 2012).

O modelo da MCA possui algumas limitações principalmente pelo fato de ser um teste executado em uma membrana que já vem sofrendo mudanças rápidas em sua morfologia, vascularização e proliferação de células endoteliais devido ao contínuo desenvolvimento embrionário. Ou seja, as mudanças geradas na MCA, pela aplicação de substâncias ou biomateriais, podem ser confundidas com o acelerado processo natural que ocorre no desenvolvimento embrionário. Para que isso não ocorra é imprescindível que o momento de administração da substância testada e a duração dos ensaios sejam padronizados de acordo com a literatura atualizada (TUFAN; SATIROGLU-TUFAN, 2005). Outra limitação desse modelo é o surgimento de reação inflamatória não específica causada pelo material teste administrado na MCA após 15 dias de incubação, o que pode desencadear a formação de uma resposta vasoproliferativa secundária, causando dificuldade na quantificação da resposta primária. Entretanto, quando este material é aplicado em um período relativamente precoce do desenvolvimento embrionário, essas reações inflamatórias ocorrem com menor frequência, uma vez que, o sistema imunológico do embrião ainda se encontra imaturo neste período (RIBATTI et al., 2001; RIBATTI, 2016).

Vários métodos qualitativos, quantitativos e semi-quantitativos, tais como, análise do comprimento, diâmetro e densidade dos vasos, dos pontos de ramificação dos vasos e da área



total da MCA, tem sido descritos na literatura para avaliação de angiogênese e antiangiogênese em níveis macro e microscópicos (RIBATTI et al.,2010). A quantificação da vascularização da MCA pode ser realizada através de métodos morfométricos aplicados a imagens digitais. Além disso, as membranas podem ser imersas em parafina para realização de análises histológicas. Por outro lado, a MCA não fixada em formaldeído pode ser utilizada em estudos de quantificação de RNA (análise da expressão de genes por meio de PCR quantitativa em tempo real – qRT-PCR), proteínas e teor de colágeno (RIBATTI, 2012).

### **1.5. Papel das metaloproteinases no processo angiogênico**

A angiogênese é um processo que requer proteólise da matriz extracelular, proliferação e migração de células endoteliais e síntese de novos componentes da matriz. A degradação da matriz é regulada principalmente por um equilíbrio entre os diferentes grupos de metaloproteinases (MMPs). Durante a neovascularização, fatores angiogênicos são capazes de ativar células endoteliais que revestem os vasos pré-existentes. Essas células são responsáveis pela liberação de enzimas, como as MMP-2 e MMP-9, conhecidas como gelatinases, as quais irão atuar no remodelamento da matriz durante o processo angiogênico (STETLER-STEVENSON, 1999; LIU et al., 2017).

Uma das etapas cruciais do processo de cicatrização de feridas é a angiogênese, pois a formação de um tecido rico em vasos sanguíneos representa um ponto crítico na regeneração tecidual. Tanto a MMP-2 quanto a MMP-9 atuam como reguladores da angiogênese durante a cicatrização tecidual, devido sua capacidade de ativar citocinas pró-angiogênicas (CALEY et al., 2015). De acordo com Stetler-Stevenson (1999), estudos que utilizaram inibidores de MMPs em testes angiogênicos *in vitro* e *in vivo*, observaram a ocorrência de inibição ou retardamento das respostas angiogênicas, o que demonstra que a atividade das MMPs está intimamente ligada à angiogênese. Além de seu papel angiogênico, as metaloproteinases são capazes de emitir sinais celulares expressos, por exemplo, por meio da liberação de fragmentos clivados de proteínas degradadas. Esses sinais promovem a migração de queratinócitos e fibroblastos para o local da ferida e consequente aceleração do processo de regeneração tecidual. Portanto, as MMPs desempenham um papel fundamental durante todas as fases da regeneração tecidual, pois além de modificar a matriz do tecido lesado, elas permitem a migração celular e a remodelamento do tecido (CALEY et al., 2015; SABINO; KELLER, 2015).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1- Objetivo geral

Avaliar o potencial angiogênico das diferentes frações do látex de *Hancornia speciosa*, visando identificar qual dessas frações tem potencial para ser utilizada como biomaterial para aplicações médicas. Além disso, pretende-se identificar os principais metabólitos secundários presentes na fração com maior atividade angiogênica.

### 2.2- Objetivos específicos

O presente trabalho possui os seguintes objetivos específicos:

- Identificar a fração do látex de mangabeira que é responsável pelo processo de angiogênese em membranas corioalantóides (MCA) de ovos embrionados de galinha e validar sua atividade angiogênica a nível morfológico, histológico e molecular;
- Realizar a prospecção química da fração do látex de *H. speciosa* com maior atividade angiogênica.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta e fracionamento do látex

As amostras de látex de *H. speciosa* foram coletadas em árvores da coleção de mangabeiras da Universidade Estadual de Goiás (UEG), no município de Ipameri/Goiás. A coleta foi realizada segundo metodologia de sangramento das árvores por gotejamento do látex em tubos falcon estéreis. O látex foi estabilizado em água (100 µL de água destilada para cada 20 mL de látex) e submetido ao processo de separação de fases. O fracionamento do látex foi realizado no laboratório de Biotecnologia da UEG, câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas, no município de Anápolis/Goiás.

A separação de fases do látex de *H. speciosa* foi feita através de duas centrifugações de alta velocidade em centrífuga refrigerada da marca Thermo scientific modelo Heraeus Megafuge 16R. Cada centrifugação teve a duração de 1 h, a 22.000 g e - 4 °C. Após centrifugação, o látex apresentou três fases: a primeira de menor densidade, a qual é predominantemente composta por partículas de borracha (isopreno); a fração aquosa intermediária composta pelo soro e a fração de fundo ou precipitado, como mostra a Figura 5. As fases foram retiradas dos eppendorfs e isoladas com o auxílio de micropipetas e seringas com agulha. Após separadas, as frações foram armazenadas em freezer - 20 °C, para posterior utilização no ensaio da MCA de ovos fertilizados de galinhas.

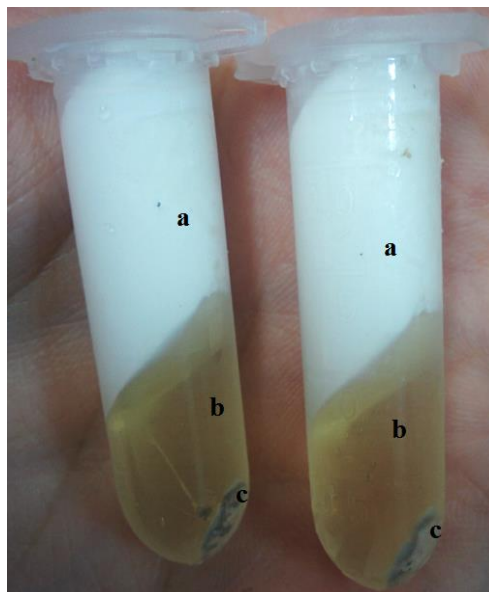


Figura 5: Composição do látex de *H. speciosa*. O látex de *H. speciosa* foi coletado e centrifugado em alta velocidade (22.000 g a -4 °C, durante 1 h), segundo metodologia

adaptada de Yeang et al., (2002) e Honorato (2005). O látex foi separado em três principais frações: a fração borracha (a), a fração soro (b) e a fração de fundo ou precipitado (c).

### 3.2. Drogas e reagentes

Foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes no ensaio da MCA em ovos embrionados de galinha:

- Água estéril e apirogênica para injeção (Samtec Biotecnologia);
- Solução de Dexametasona 0,1 mg/mL (Laboratório farmacêutico EMS)
- Regederm<sup>®</sup> (Pelenova Biotecnologia): pomada comercial estimuladora de angiogênese que possui em sua constituição o soro do látex de *H. brasilienses*;
- Thiopentax<sup>®</sup> pó estéril, 1,0 g (Cristália – Produtos químicos farmacêuticos Ltda);
- Formaldeído 37% (Vetec Química Fina Ltda)

### 3.3. Teste da membrana corioalantóide (MCA) em ovos de galinha fertilizados

O potencial angiogênico do látex de *H. speciosa* foi avaliado por meio do teste da MCA em ovos de galinha (*Gallus domesticus*) fertilizados, de acordo com a metodologia descrita no trabalho de Melo-Reis et al. (2010). Esse ensaio foi realizado no laboratório de Biotecnologia da UEG, campus de Ciências Exatas e Tecnológicas, no município de Anápolis/Goiás.

Os ovos de galinha fertilizados foram obtidos na Chácara São Domingos, no município de Aparecida de Goiânia/Goiás. Utilizou-se 120 ovos distribuídos entre seis grupos experimentais, sendo cada grupo composto por 20 ovos. Os grupos experimentais foram submetidos aos seguintes tratamentos: 1. Água (controle neutro); 2. Dexametasona (controle inibidor), composto inibidor de angiogênese; 3. Regederm<sup>®</sup> (controle indutor); 4. Fração borracha do látex de mangabeira; 5. Fração soro do látex de mangabeira; e 6. Fração F1 do látex de mangabeira, composta pelo precipitado contendo pouco de fração soro.

Realizou-se, primeiramente, a higienização dos ovos com água e algodão e posteriormente, esses ovos foram incubados a 37 °C em uma câmara umidificada (60-70% de umidade relativa). No quinto dia de incubação, foi feito, com o auxílio de micro retífica, um orifício circular na extremidade maior da casca do ovo, local no qual se encontra a câmara de ar. A seguir, a membrana branca presente abaixo da casca foi removida (Figura 6) e o orifício do ovo lacrado com fita adesiva (Durex<sup>®</sup>). Após esse processo, retornaram-se os ovos à

incubadora. No décimo terceiro dia de incubação foram administrados os tratamentos sobre as membranas, por meio de discos de papel de filtro contendo 3  $\mu\text{L}$  de cada solução teste (Figura 7). Esses discos foram colocados na região da membrana em que eram visíveis os vasos sanguíneos de maior calibre.

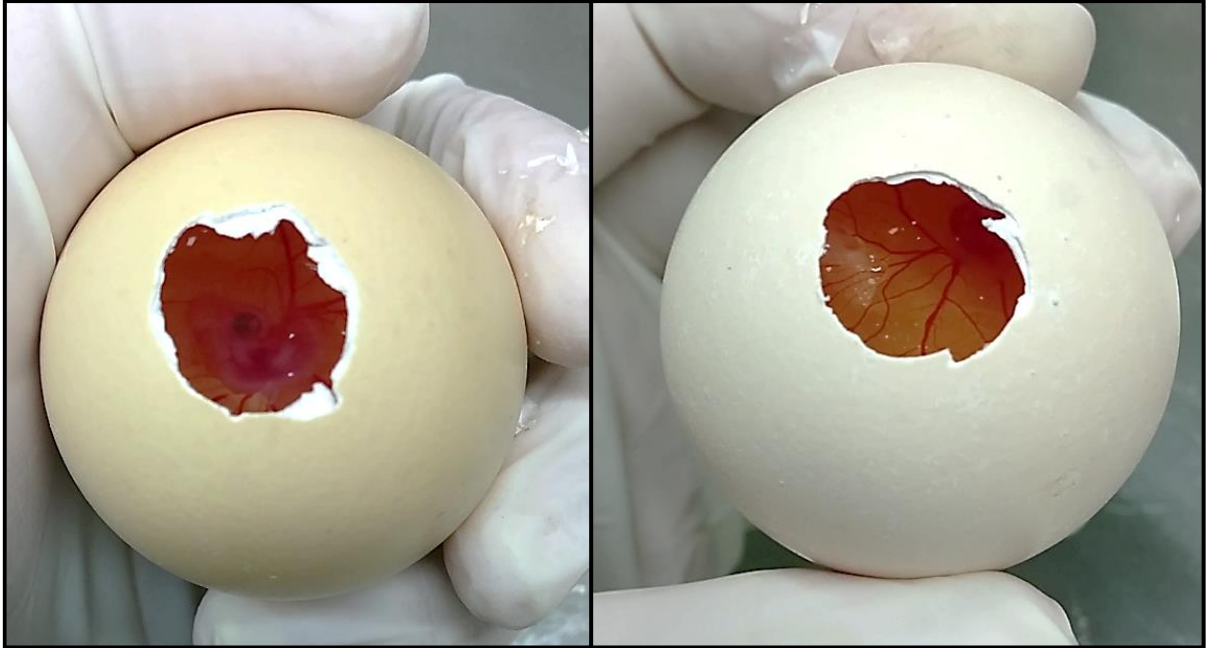


Figura 6: Fotos dos ovos no quinto dia de incubação. Neste dia foi construído um orifício circular na extremidade maior da casca e depois a membrana branca presente abaixo da casca foi retirada.

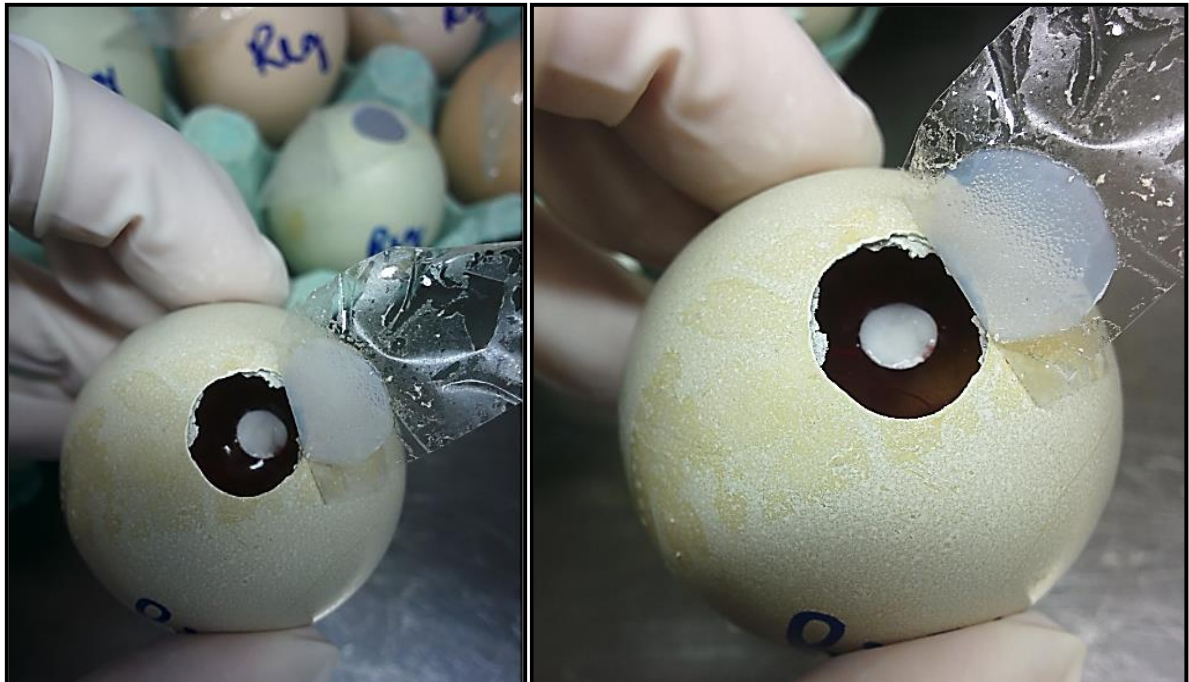


Figura 7: Fotos dos ovos no décimo terceiro dia de incubação, no qual foram administrados os tratamentos sobre as membranas, por meio de discos de papel de filtro embebidos com as soluções testadas.

A resposta angiogênica foi avaliada 72 h após os tratamentos. Para isso, primeiramente, os embriões foram submetidos a eutanásia por meio de overdose de analgésico Thiopentax<sup>®</sup> 325 mg/mL (Cristália). Após eutanásia dos embriões, as MCAs foram fixadas em formaldeído (3,7%) durante 10 min e removidas dos ovos, em seguida, com tesouras e depois mantidas em placas de Petri com solução de formaldeído. Através de um estereoscópio trinocular com câmera acoplada, da marca Biotika, foram tiradas fotos das MCAs tratadas com os diferentes tratamentos, no aumento de 30X. A análise e quantificação da rede vascular neoformada se deu por meio das imagens capturadas, as quais foram processadas nos *softwares* Gimp e Image J, versão 1.28 (ver maiores detalhes no Apêndice A). No programa Gimp realizou-se a edição das imagens quanto à saturação, luz e contraste, com objetivo de obter a melhor resolução dos vasos sanguíneos. Já no Image J, determinou-se a área percentual de vascularização de cada membrana, através da quantificação dos pixels correspondentes. A porcentagem da área de MCAs entre grupos controles e tratados foram comparados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, com um nível de significância de  $p \leq 0,05$ .

As membranas utilizadas para a análise da expressão gênica foram obtidas de forma diferente das utilizadas na análise histológica. Nesse caso, os ovos foram submetidos a resfriamento rápido, imergindo os mesmos em nitrogênio líquido. Após a eutanásia dos embriões em nitrogênio líquido, as MCAs foram removidas com tesouras e mantidas em Trizol (Tri-Reagent, Sigma Aldrich<sup>®</sup>), à -80 °C, até a etapa de extração do RNA.

#### **3.4. Análise histológica das membranas corioalantóides**

Além da análise da porcentagem de vascularização, a atividade angiogênica das frações do látex de mangabeira foi averiguada em nível histológico. Para isso, cinco MCAs de cada tratamento (água, dexametasona, Regederm<sup>®</sup>, fração borracha, soro e F1 do látex de mangabeira) foram mantidas em formaldeído tamponado 10% a 4 °C. A análise histológica das MCAs foi realizada na Universidade Federal de Goiás, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, sob a supervisão do Professor Dr. Ruy Lino de Souza Júnior.

O procedimento histológico consistiu na formação dos blocos histológicos contendo as MCAs (Apêndice B). Para isso, as MCAs foram primeiramente, fixadas em formaldeído tamponado 10% e posteriormente, foram desidratadas ao passarem por uma bateria de álcool

absoluto. Após desidratadas, as MCAs foram diafanizadas em xilol e depois impregnadas em parafina. Em seguida, com o auxílio de caixinhas de papel, as MCAs foram incluídas em parafina para realização do corte histológico em micrótomo. Após os blocos serem seccionados, os cortes das membranas (de 5  $\mu\text{m}$ ) foram fixados em lâminas, as quais foram coradas com os corantes hematoxilina-eosina (HE). Por fim, a montagem final das lâminas foi realizada colocando-se uma gota de Entellan (Merck Millipore<sup>®</sup>) em lâminulas, as quais foram colocadas sobre o corte presente em cada lâmina.

A análise histológica consistiu na avaliação dos seguintes parâmetros histológicos: 1. Presença de elementos inflamatórios, 2. Presença de células do conjuntivo e 3. Surgimento de novos vasos (angiogênese). Os resultados foram visualmente classificados seguindo uma ordem de intensidade, sendo: 0 – ausente, 1 – discreto, 2 – moderado e 3 – acentuado. Os dados histológicos foram analisados estatisticamente por meio do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e as comparações entre os grupos foram realizadas através do método de comparações múltiplas de Dunn's, sendo considerados como significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

### **3.5. Avaliação da expressão de genes associados à angiogênese**

A atividade angiogênica das frações do látex de *H. speciosa* também foi avaliada por meio de análise de expressão de genes associados à angiogênese. Desta forma, foi avaliada a expressão dos genes para metaloproteinase 2 e 9 (*mmp-2* e *mmp-9*) nas membranas submetidas aos diferentes tratamentos. Essa análise molecular foi realizada no laboratório de Genética & Biodiversidade da Universidade Federal de Goiás, sob a supervisão da professora Mariana Pires de Campos e Telles e no laboratório de Biotecnologia da UEG, câmpus de Ciências Exatas e Tecnológicas, no município de Anápolis/Goiás.

Para avaliar a expressão dos genes associados à angiogênese, primeiramente foi feita a extração dos RNAs totais das membranas tratadas, utilizando o método de Trizol (Tri-Reagent, Sigma Aldrich<sup>®</sup>), conforme Mangieri e colaboradores (2008), com modificações. Primeiramente, as membranas imersas no Trizol foram congeladas em nitrogênio líquido e trituradas mecanicamente. Posteriormente, as amostras foram incubadas durante 5 min em temperatura ambiente. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas na velocidade de 16.100 g, durante 15 min a 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi transferido para um microtubo novo, ao qual foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de clorofórmio. As amostras foram, então, agitadas vigorosamente por 15 s e, posteriormente, incubadas em gelo durante 5 min. Em seguida,

centrifugou-se as amostras a 22.000 g, durante 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi retirado das amostras e colocado em novos microtubos. A esses sobrenadantes adicionou-se 300 µL de isopropanol para cada 1mL de trizol. Essa mistura foi homogeneizada suavemente por inversão e deixada em freezer - 20 °C durante 2 h para que pudesse ocorrer a precipitação do RNA. Após repouso em freezer, as amostras foram centrifugadas a 22.000 g, durante 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi descartado, restando o RNA precipitado no tubo. O precipitado foi então lavado duas vezes com 500 µL de etanol 75%, sendo centrifugado durante 5 min, a 11.180 g e 4 °C, a cada lavagem. Em seguida, o excesso de álcool foi retirado e as amostras foram deixadas em repouso para secagem. Por fim, solubilizou-se o RNA total precipitado em 50 µL de água de osmose-reversa autoclavada, o qual foi estocado em freezer - 80°C.

A integridade do RNA total de cada amostra foi analisada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A quantificação da concentração dos RNA totais foi realizada em espectrofotômetro SpectraMax Paradigm da Molecular Devices. Desta forma, após verificação de suas qualidades e concentrações, os RNAs foram preparados para serem utilizados na técnica de qRT-PCR. Para isso, primeiramente, os RNAs totais foram tratados com a endonuclease DNase I (1U/µL) da Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, a fim de eliminar qualquer DNA genômico contaminante das amostras, conforme protocolo específico fornecido pelo fabricante.

Para a síntese dos cDNAs utilizados posteriormente na PCR quantitativa em tempo real, foi utilizado o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme orientações do fabricante. A análise da expressão diferencial dos cDNAs sintetizados foi realizada no sistema *Applied Biosystems Step One Plus real-time PCR* (Applied Biosystems Inc.). Para isso, utilizou-se o kit GoTaq<sup>®</sup> qPCR Master Mix da Promega. Como controle endógeno, foi utilizado o transcrito codificante para 18S rRNA de *Gallus gallus* (GenBank: M59389.1). A sequência dos primers utilizados neste trabalho estão apresentados na Tabela 2. As reações foram realizadas em triplicata para cada amostra de cDNA e os níveis de expressão relativa dos cDNAs analisados foram calculados utilizando-se o método de curva padrão para a quantificação relativa (BOOKOUT et al., 2006).

Tabela 2: Sequência dos primers utilizados na PCR quantitativa em tempo real.

Primers	Sequências (5' – 3')	Tm (°C)
18S rRNA	Senso: TGTGCCGCTAGAGGTGAAATT	62,2
	Antisenso: TGGCAAATGCTTTCGCTTT	62,2
MMP-2	Senso: GATGGCAAGCTGTGGTGTGC	62,5
	Antisenso: TGGGTCCTCGGAGTGCTCTA	61,8
MMP-9	Senso: CGCCTCCTATGACACCTGCA	61,9
	Antisenso: TGTCTCGGTTGGGGCAGAAG	62,1

A análise estatística dos dados referentes à expressão de genes ligados ao processo de angiogênese foi realizada utilizando o Teste t de Student, sendo considerados resultados estatisticamente significativos os valores de  $p \leq 0,05$ . Desta forma, todas as amostras foram comparadas com a condição controle água.

### 3.6. Prospecção fitoquímica da fração soro do látex de *H. speciosa*

Após a análise do potencial angiogênico em ensaios biológicos usando as MCAs, foi realizada a prospecção fitoquímica da fração soro do látex de *H. speciosa*, através de análise qualitativa, para identificação das principais classes de metabólitos secundários encontrados em plantas, de acordo com a metodologia descrita por Matos (1988), Matos; Matos (1989) e Costa (2001). O objetivo foi identificar: 1) compostos fenólicos, como taninos e heterosídeos flavonóides; 2) heterosídeos cumarínicos; 3) heterosídeos antraquinônicos e 4) alcalóides. A triagem fitoquímica da fração soro foi realizada na Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO), sob a supervisão do Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges.

Para a realização de todas as análises fitoquímicas, foi utilizada a fração soro dissolvida em etanol P.A (1:1). A primeira triagem realizada contou com a busca por compostos fenólicos na amostra. Para isso, realizou-se quatro reações de identificação: reação com gelatina (quatro gotas de gelatina a 2,5% em 2 mL de soro), reação com alcalóides (quatro gotas de sulfato de quinina a 1% em 2 mL de soro), reação com sais metálicos (duas gotas de cloreto férrico a 10% em 2 mL de soro) e reação com hidróxidos alcalinos (cinco gotas de hidróxido de sódio a 20% em 2 mL de soro). Em todas as reações observou-se se houve a ocorrência de precipitado e/ou mudança de coloração.

A pesquisa por flavonoides foi feita, primeiramente, por meio da reação com

hidróxidos alcalinos, na qual foram colocados 400  $\mu$ L de hidróxido de sódio a 20% em 1 mL de soro. Em seguida, realizou-se a reação com ácido sulfúrico, onde foi evaporado até semi-secura 1 mL de soro, em cápsula de porcelana. Posteriormente, adicionou-se 300  $\mu$ L de ácido sulfúrico a 10% e observou-se sob luz ultravioleta (UV) o surgimento de fluorescência. A seguir, foi feita a reação oxalo-bórica, na qual foram evaporados em cápsula de porcelana 1 mL de soro. Foi adicionado ao resíduo semi-seco 1 mL de ácido bórico a 3% e 400  $\mu$ L de ácido oxálico. Após secar a amostra, foi misturado ao resíduo seco 7 mL de éter etílico, o qual foi observado sob luz UV. Depois, foi realizada a reação com cloreto de alumínio, onde colocou-se em um béquer 1 mL de soro, o qual foi aquecido e concentrado até metade do volume e colocado, posteriormente, em papel de filtro juntamente com 2 mL de cloreto de alumínio a 5%. A presença de fluorescência foi observada em luz UV. Realizou-se também a reação de cianidina ou reação de Shinoda misturando 1 mL de soro a 400  $\mu$ L de ácido clorídrico (10%) e a 1cm de fita de magnésio. Por último, foi feita a reação com cloreto férrico adicionando-se duas gotas de cloreto férrico a 4,5% em 1 mL de soro. As cores resultantes nas duas últimas reações descritas foram anotadas. Todos os resultados observados na busca por flavonóides foram comparados com a Tabela 3.

Tabela 3: Possíveis classes de flavonóides determinadas de acordo com as colorações obtidas em reações de pesquisa de heterosídeos flavonóides.

<b>Reação</b>	<b>Flavonas</b>	<b>Flavonóis</b>	<b>Flavanonas</b>	<b>Chalconas</b>	<b>Isoflavonas</b>
NaOH	Amarela	Amarelo-escura	Amarela	Amarela	Amarela
Oxalo-bórica	-	Fluorescência amarelo-verde	-	-	-
AlCl <sub>3</sub>	Amarelo- verde	amarela	Fluorescência azul-verde	Amarela	Amarela- castanha
Cianidina	Laranja	vermelha	Violeta	-	-
FeCl <sub>3</sub>	Verde	verde-castanha	verde-castanha	Amarela	Verde

\*A cor obtida em cada reação determina a classe de flavonóide presente na amostra.

A procura por heterosídeos cumarínicos foi feita por meio da adição de uma gota de hidróxido de sódio 1N a 1 mL de soro e o aparecimento de fluorescência verde foi observada. Já na pesquisa por heterosídeos antraquinônicos foram adicionados 30 mL de álcool a 75% em 1 mL de soro. Colocou-se em um primeiro béquer 10 mL dessa solução e adicionou-se 0,5 mL de ácido clorídrico 10% e ferveu-se por 2 min. Em um segundo béquer o mesmo



procedimento foi feito, porém sem adicionar ácido. Os líquidos foram transferidos para tubos de ensaio e, após esfriarem, foi adicionado a cada um 10 mL de éter. As soluções foram agitadas levemente e separados 5 mL dos tubos um e dois. Em ambos pipetou-se 4 mL de amônia a 10% e deixou-se as soluções em repouso, durante 5 min. Após esse período, foram observadas as cores das soluções.

Por fim, foi realizada a pesquisa de alcalóides por meio da adição de 20 mL de ácido sulfúrico a 5% em 2 mL de soro. Distribuíram-se três gotas dessa solução em três lâminas de vidro e em cada uma delas foram gotejadas quatro gotas de diferentes reativos gerais dos alcalóides. Os reativos iodados utilizados foram: reativo de Bouchardat, reativo de Dragendorff e reativo de Mayer.

### **3.7. Comitê de ética**

O projeto de pesquisa referente a essa dissertação foi submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Goiás – CEUA/UEG, o qual aprovou as metodologias adotadas neste trabalho sob o protocolo de aprovação nº. 007/2016 (Anexo I).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Atividade angiogênica das frações do látex de *H. speciosa*

A análise das imagens digitalizadas das MCAs mostraram a formação de uma rede vascular mais densa nas membranas que foram tratadas com frações do látex de mangabeira, soro e F1, e com Regederm® (controle indutor), quando comparadas com a água (Figura 8). Por outro lado, as membranas tratadas com dexametasona (controle inibidor) e com a fração borracha do látex de *H. speciosa* apresentaram diminuição da densidade vascular, quando comparado à água. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho realizado por Almeida et al. (2014), o qual analisou a atividade angiogênica do látex de *H. speciosa* diluído em água e em amônia e verificou que MCAs tratadas com esse látex diluído em água apresentaram um aumento significativo na densidade de vasos, quando comparadas ao grupo controle (água).

A Tabela 4 demonstra as porcentagens de vascularização medidas a partir da análise morfométrica das imagens das MCAs, obtidas em estereoscópio e analisadas por software que quantifica o número de pixels presentes nas imagens. As análises estatísticas demonstraram que houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre a vascularização promovida pelos tratamentos testados. Desta forma, por meio do teste de Tukey (Tabela 4), observou-se que as médias de vascularização obtidas nos grupos tratados com látex de mangabeira (soro e F1) e Regederm® não diferiram estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ). Porém, as médias dos grupos tratados com látex diferiram significativamente do controle neutro, do inibidor e da fração de borracha ( $p \leq 0,05$ ). Além disso, para a fração borracha não observou-se diferença estatística com o grupo dexametasona ( $p > 0,05$ ).

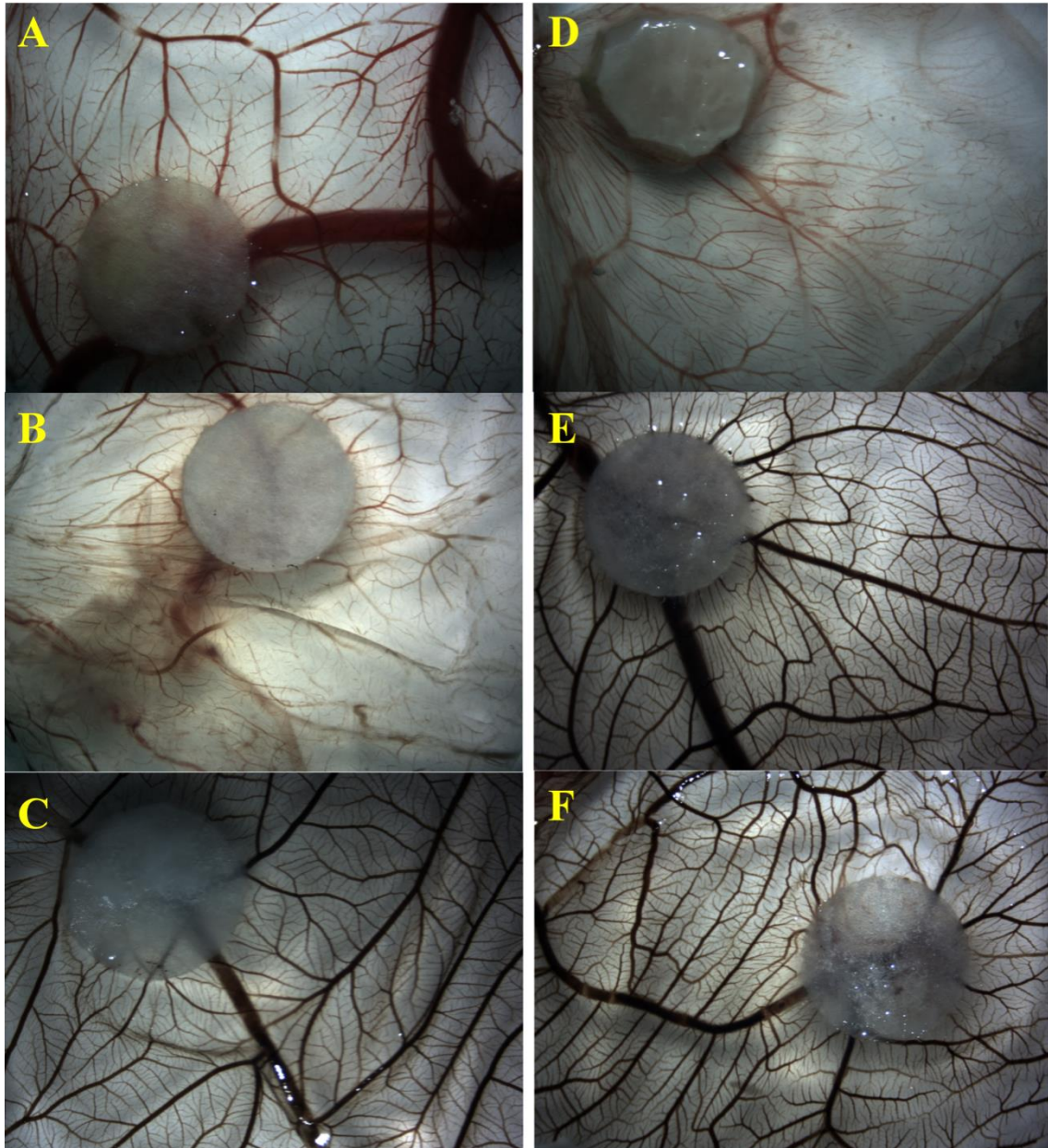


Figura 8: Fotos representativas das membranas corioalantóides submetidas aos seis tratamentos, sendo A, B e C os controles (A: água, B: dexametasona, C: Regederm®) e D, E e F os frações do látex de *H. speciosa* (D: borracha, E: soro, F: F1). As imagens foram capturadas em estereoscópio, no aumento de 30X.

Tabela 4: Porcentagem de vascularização das membranas corioalantóides, obtidas com os tratamentos das frações de látex de mangabeira e diferentes controles.

	Porcentagem de vascularização					
	Água	Dexametasona	Regederm®	Borracha	F1	Soro
<b>Média</b>	14,004	9,8646*	29,849*	9,5573*	28,165*	29,348*
<b>Desvio padrão</b>	4,2552	3,0024	4,0816	2,6491	4,9747	5,3025
<b>Teste de Tukey**</b>	A	B	C	B	C	C

\*Teste Anova one way (nível de significância:  $p \leq 0,05$ ) e \*\*Teste de Tukey, onde letras iguais

significam que a diferença entre os grupos não foi significativa ( $p > 0,05$ ) e letras diferentes determinam entre quais grupos houve diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).

As frações soro e F1 administradas sobre as MCAs geraram aumento significativo na rede vascular neoformada, quando comparadas a água, dexametasona e fração borracha ( $p \leq 0,05$ ), o que sugere o seu alto potencial angiogênico. Além disso, o fato de não ter sido observada diferença estatística entre as frações soro e F1 com o grupo tratado com Regederm® sugere que essas frações possuem potencial angiogênico semelhante ao controle indutor, o qual é considerado atualmente, um composto referência na indução de angiogênese e cicatrização de feridas. Por outro lado, sugere-se que a fração borracha do látex de *H. speciosa* possui ação antiangiogênica, uma vez que, sua média de vascularização não diferiu estatisticamente do inibidor (dexametasona).

A análise da atividade angiogênica das MCAs submetidas aos diferentes tratamentos, foi avaliada também a nível histológico. Sabe-se que durante o processo de cicatrização de feridas, a ocorrência de danos teciduais irá estimular a proliferação e migração de fibroblastos e a liberação de elementos inflamatórios nas áreas feridas (WIEGAND; HIPLER, 2008). A presença de células inflamatórias nesse processo regenerativo é de grande importância, pelo fato dessas células serem responsáveis pela ativação de vários fatores angiogênicos, tais como: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), metaloproteinase 2 e 9 (MMP2 e MMP9), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 e 8 (IL-6 e IL-8), dentre outros (MANJUNATHAN; RAGUNATHA, 2015). Os fatores angiogênicos, por sua vez, irão induzir o crescimento de vasos pré-existentes e a neoformação de outros vasos na região em que ocorreu a lesão tecidual (MENDONÇA et al., 2010). Já os fibroblastos (células do tecido conjuntivo) atuam diretamente na área ferida remodelando a matriz extracelular danificada, realizando degradação proteolítica da mesma e também sintetizando matriz nova, por meio da produção de macromoléculas como colágeno, glicoproteínas e glicosaminoglicanos, as quais são depositadas na matriz recém-formada (WIEGAND; HIPLER, 2008). Frente a importância de células inflamatórias e células do tecido conjuntivo no processo de regeneração tecidual, a ocorrência de tais células foi observada nas lâminas histológicas confeccionadas e estão exemplificados na Figura 9.



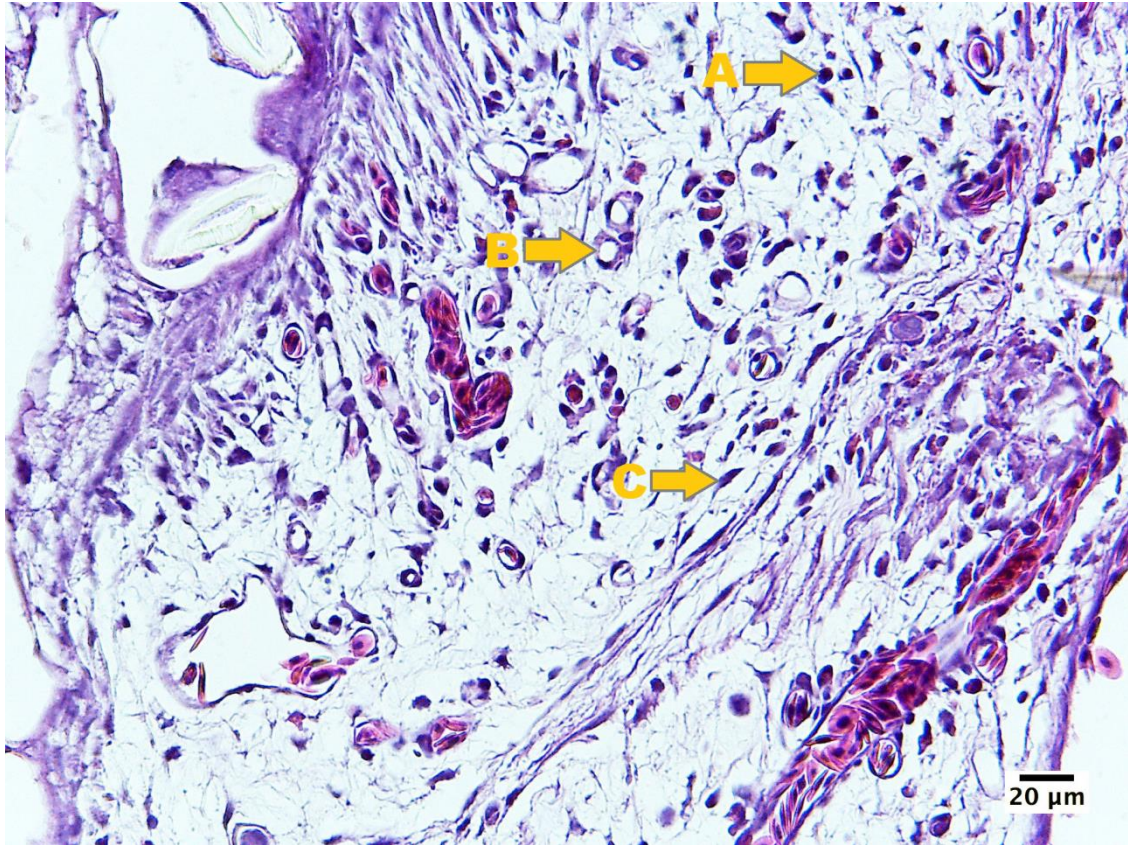


Figura 9: Fotomicrografia da MCA tratada com a fração soro de *H. speciosa*, corada por hematoxilina-eosina e vista numa escala de 20  $\mu\text{m}$ , onde: A- célula inflamatória, B- angiogênese (surgimento de novo vaso sanguíneo) e C- célula do conjuntivo.

Os resultados obtidos a partir da análise histológica estão apresentados na Figura 10 e Tabela 5. No que diz respeito a presença de células inflamatórias, os resultados demonstram que houve aumento significativo na resposta inflamatória das membranas tratadas com as frações soro, F1 e borracha do látex de *H. speciosa*, quando comparadas ao grupo da dexametasona (controle inibidor). Já referente a presença de células do conjuntivo, tais como os fibroblastos, observou-se que também houve diferença significativa quando os grupos tratados com as frações soro e F1 são comparados com todos os controles (água, dexametasona e Regederm®) e com a fração borracha. Além disso, a presença dessas células nos grupos tratados com as frações soro e F1 diferiram entre si. Nas membranas tratadas com soro houve aumento significativo na quantidade de células do conjuntivo quando estas são comparadas com os controles e com as frações F1 e borracha. Por fim, quando analisado o parâmetro de angiogênese, as membranas em que foi administrada a fração soro apresentaram aumento significativo no surgimento de novos vasos, quando comparadas aos demais grupos.



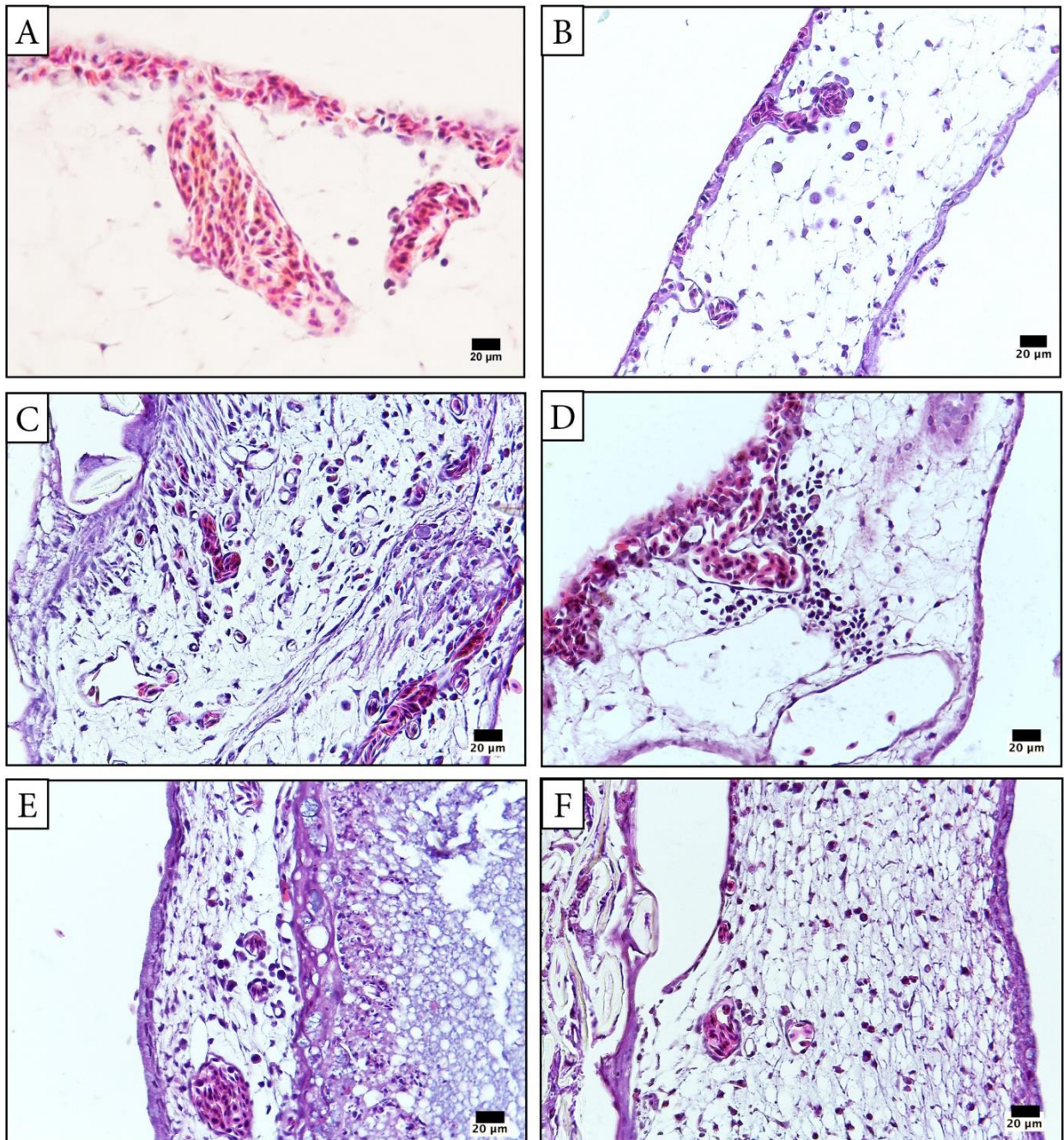


Figura 10: Fotomicrografia das membranas corioalantóides coradas com hematoxilina-eosina e vistas numa escala de 20 µm, sendo: (A) o controle inibidor tratado com dexametasona, (B) o controle neutro tratado com água, (C) o grupo tratado com a fração soro do látex de *H. speciosa*, (D) o grupo tratado com a fração borracha do látex de mangabeira, (E) o controle indutor tratado com Regederm® e (F) o grupo em foi adminstrada a fração F1 do látex de mangabeira.

Tabela 5: Análise dos parâmetros histológicos das membranas corioalantóides tratadas com os grupos controle e frações do látex de mangabeira.

TRATAMENTOS	INFLAMAÇÃO		CÉL. CONJUNTIVO		ANGIOGÊNESE	
	Mediana	Teste Dunn's	Mediana	Teste Dunn's	Mediana	Teste Dunn's
Água	1	A	0	A	0	A
Dexametasona	0	AB	0	A	0	A
Regederm®	0,5	A	0	A	0,5	A
Borracha	1	AC	0	A	0	A
Soro	2	AC	2	B	2,5	B
F1	2	AC	1	C	1,5	AB
<b>Valor de p</b>	*p=0,002	**p<0,005	*p<0,001	**p<0,005	*p=0,003	**p<0,005

\*Teste Kruskal-Wallis e \*\*Teste de comparações múltiplas de Dunn's, onde valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. Além disso, letras iguais significam que a diferença entre os grupos não foi significativa e letras diferentes representam  $p \leq 0,05$ .

Os dados histológicos (Figura 10 e Tabela 5) mostraram que a fração soro do látex de mangabeira possui forte potencial angiogênico, visto que ela foi capaz de recrutar células inflamatórias e células do conjuntivo para a região em que foi administrada. Esses eventos exerceram juntos o estímulo para o crescimento de novos vasos sanguíneos. Na realidade, a análise microscópica das MCAs traz uma visão mais completa do processo de angiogênese que está ocorrendo nas membranas testadas do que a simples quantificação da porcentagem de vascularização. Através da histologia é possível sugerir que o soro do látex de mangabeira tem um potencial angiogênico superior ao Regederm®, pois apresentou melhores resultados nos quesitos inflamação, células do conjuntivo e angiogênese. De forma geral, ambas as análises de imagem e histológica, revelaram que a fração soro do látex de mangabeira representa um importante agente angiogênico e que este biomaterial possui potencial terapêutico para ser explorado pelas ciências médicas.

A atividade angiogênica do látex na MCA pode ter sido gerada pela indução de uma resposta inflamatória causada pela toxicidade do látex ao tecido (BESSA et al., 2015). O látex de origem vegetal é uma mistura tóxica de compostos orgânicos e inorgânicos, com materiais cerosos, proteínas e enzimas, a qual desempenha a função de defesa contra microorganismos, herbívoros e demais predadores (KONNO, 2011). As análises histológicas demonstraram que frações do látex de mangabeira foram capazes de gerar um aumento significativo na quantidade de células inflamatórias, fibroblastos e novos vasos sanguíneos, em comparação

com os grupos controle (Figura 10 e Tabela 5). A literatura tem reportado que a angiogênese e o processo inflamatório são eventos que se complementam mutuamente (JACKSON et al., 1997; ARAUJO et al., 2016). Isso se explica pelo fato de que células inflamatórias, como macrófagos, linfócitos, mastócitos e leucócitos, atuam na ativação de fatores específicos, como as citocinas, interleucinas e fator de crescimento endotelial vascular, os quais amplificam a resposta inflamatória e estimulam fatores responsáveis pelo crescimento de vasos pré-existentes e pelo desenvolvimento de novos vasos (ZIJLSTRA et al., 2006; MELO-REIS et al., 2015). Tanto o processo inflamatório quanto a angiogênese são eventos facilmente observados no modelo da MCA (RIBATTI, 2012).

O modelo da MCA de ovos embrionados de galinha tem sido utilizado para avaliação de atividade angiogênica em diferentes pesquisas que envolvem plantas medicinais (CHAVES et al., 2016). Dentre os estudos que utilizaram esse modelo, Almeida et al. (2014), avaliou o potencial angiogênico do látex de *H. speciosa* e verificou que esse látex é angiogênico, porém não encontrou diferença significativa entre a atividade regenerativa do látex de mangabeira e de *H. brasilienses*, tanto nas análises morfológicas, quanto nas histológicas. Já Chaves et al. (2016) avaliou a atividade angiogênica da solução aquosa da casca do barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) e comprovou seu potencial angiogênico pelo alto índice de vascularização gerado na MCA e pela intensa presença de tecido conjuntivo, elementos inflamatórios e vasos sanguíneos nas lâminas histológicas das membranas tratadas com Regederm® e com barbatimão. Porém, o autor não encontrou diferença significativa entre o potencial regenerativo dos dois tratamentos. Outros autores, que realizaram as mesmas análises morfológicas e histológicas na MCA, também não encontraram diferença significativa entre a atividade angiogênica de suas plantas medicinais e dos biomateriais a base do látex de seringueira (MELO-REIS et al., 2010; ARAUJO et al., 2015; BESSA et al., 2015; ARAUJO et al., 2016; CARNEIRO et al., 2016). Por outro lado, foi demonstrado neste trabalho, por meio das análises histológicas, que a fração soro do látex de mangabeira apresentou um incremento significativo na atividade angiogênica quando comparada ao Regederm®.

O estímulo da angiogênese por fármacos vem atraindo a atenção da comunidade científica nos últimos anos (ARAUJO et al., 2016). Tais substâncias podem ser utilizadas não somente para acelerar o processo de cicatrização, mas também para o reparo de tecidos, pelo fato de serem capazes de promover o crescimento e surgimento de vasos sanguíneos no tecido danificado (CHAVES et al., 2016). Além disso, substâncias angiogênicas possuem grande variedade de aplicações clínicas, dentre elas: aumento da vascularização miocárdica após a



ocorrência de um infarto, reparo do sistema nervoso central após algum trauma ou isquemia, além da cicatrização de feridas de diferentes origens (CARNEIRO et al., 2016). O fato da fração soro do látex de mangabeira ter demonstrado ser um agente angiogênico representa uma alternativa para os estudos que buscam outras fontes de compostos bioativos para serem utilizados no processo de cicatrização tecidual. Várias plantas, além da *H. speciosa* (ALMEIDA et al., 2014) e *H. brasilienses* (MRUÉ, 2000) estão sendo investigadas quanto ao seu potencial angiogênico, tais como: *Stryphnodendron adstringens* (CHAVES et al., 2016), *Curcuma longa* (ARAUJO et al., 2016), *Tabebuia impetiginosa* (MORAES et al., 2016), *Aloe vera* (BRANDAO et al., 2016), *Euphorbia tirucalli* (BESSA et al., 2015), *Pterodon emarginatus* (ARAUJO et al., 2015), *Euphorbia caducifolia* (GOYAL et al., 2012), *Calendula officinalis* (PARENTE et al., 2011), *Synadenium umbellatum* (MELO-REIS et al., 2010), *Carica candamarcensis* (MELLO et al., 2008), dentre outras.

No que se refere à cicatrização de feridas, nas últimas décadas tem ocorrido grandes avanços no acúmulo de conhecimentos a cerca dos diversos fatores e eventos que ocorrem durante o processo regenerativo (MRUE et al., 2004). Além disso, diferentes pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de se criar novas tecnologias e novos materiais biocompatíveis voltados para o tratamento de lesões teciduais (PENHAVEL et al., 2016). No entanto, ainda há muito que se descobrir, principalmente sobre plantas medicinais, as quais podem se tornar um recurso acessível e economicamente viável, de tal forma que possa ser adquirido e utilizado também em países subdesenvolvidos, os quais ainda possui alta incidência de lesões crônicas, em especial em populações carentes e portadores de diabetes (MALDELBAUM et al., 2003). O látex de *H. speciosa* representa um desses biomateriais de grande potencial para aplicação em cicatrização de feridas, no entanto, a característica terapêutica predominante para que esse látex desempenhe sua atividade cicatrizante ainda é desconhecida. Ou seja, não se sabe ainda quais compostos químicos são responsáveis pelo seu potencial regenerativo. Neste caso, torna-se necessário a realização de estudos fitoquímicos para identificação dos componentes presentes na fração soro do látex de mangabeira, a qual apresentou neste trabalho, comprovada atividade angiogênica.

O potencial medicinal de *H. speciosa* não se resume somente à atividade angiogênica de seu látex. O uso popular dessa planta para tratamento de enfermidades como dermatoses, diabetes, reumatismo, luxações, hipertensão, úlcera gástrica, entre outras doenças, representa um importante indicativo do potencial farmacológico da mangabeira. Devido à esse uso, estudos científicos investigaram a ação medicinal de diferentes partes dessa planta (folha, casca, fruto e látex) e constataram que elas possuem componentes bioativos capazes de atuar

no controle da pressão arterial (FERREIRA et al., 2007 a,b; SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2016), tratar feridas, doenças inflamatórias (GELLER et al., 2015), diabetes mellitus (PEREIRA et al., 2015), úlceras gástricas (MORAES et al., 2008), além de possuir atividade anti-inflamatória (MARINHO et al., 2011), osteogênica (NEVES et al., 2016), antimicrobiana (COSTA et al., 2008) e quimiopreventiva (ENDRINGER et al., 2010). Todo esse conjunto de resultados demonstra o importante potencial farmacológico dessa espécie e agrega valor econômico a mangabeira, uma vez que, esta atualmente só tem sido explorada para comercialização de seus frutos (SILVA JUNIOR, 2004) e para o uso de suas sementes na produção de biocombustível (SANTOS et al., 2015).

#### **4.2. Análise da expressão de genes ligados à angiogênese**

A avaliação da expressão de genes associados ao processo de angiogênese nas MCAs submetidas aos diferentes tratamentos está apresentada na Figura 10. Os resultados demonstram que houve aumento significativo na expressão do gene *mmp-2* nas membranas tratadas com a fração F1 do látex de mangabeira, quando esta é comparada com o grupo controle (água). Já para as membranas tratadas com dexametasona, observa-se que ocorreu diminuição da expressão desse gene, o que é esperado, uma vez que, as análises morfológica e histológica mostraram que essa substância possui potencial inibidor do processo de angiogênese. Para os demais tratamentos não se observou alteração significativa na expressão do referido gene. Por outro lado, nas análises da expressão do gene *mmp-9*, observa-se que nas membranas tratadas com o controle inibidor, fração borracha e fração F1 do látex de *H. speciosa* ocorreu diminuição significativa na expressão desse gene, quando comparadas as membranas tratadas com água.

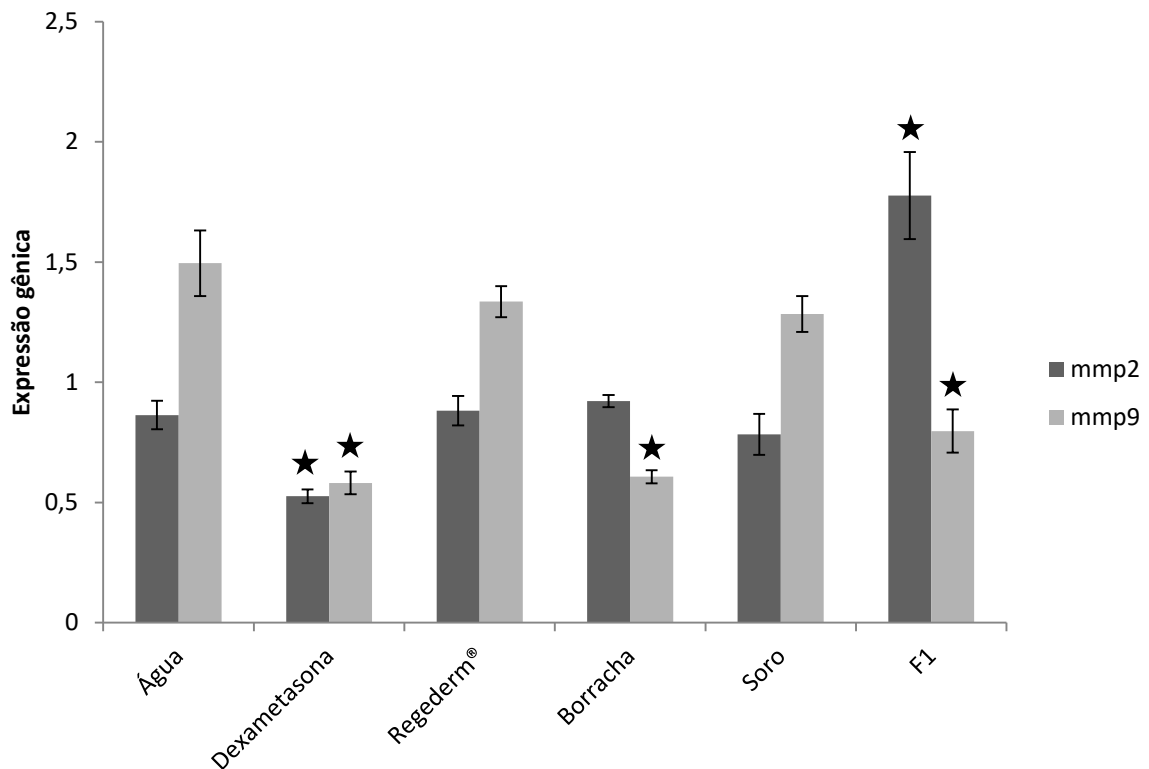


Figura 10: Quantificação normalizada da expressão dos genes *mmp-2* e *mmp-9* em cada tratamento. A estrela está marcando os grupos que diferiram estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) do grupo controle (água).

Considerando que *mmp-2* e *mmp-9* são genes associados ao processo de angiogênese, esperava-se obter nesse trabalho, uma elevada expressão desses genes nas membranas tratadas com a fração soro e F1 do látex de mangabeira, já que estas demonstraram ter potencial angiogênico nas análises morfométricas e histológicas. Entretanto, somente *mmp-2* apresentou aumento significativo da expressão na fração F1 (Figura 10). Esses resultados talvez sejam consequência do modelo biológico adotado. O modelo da MCA é clássico para análise de angiogênese e os genes *mmp-2* e *mmp-9*, apesar de terem papel importante na regulação da angiogênese, estão primariamente associados ao processo de remodelamento da matriz. É esperado que haja um acentuado remodelamento da matriz celular no modelo de cicatrização de feridas, mas talvez esse remodelamento não seja tão expressivo nas MCAs. Para melhor avaliação da resposta molecular do tratamento das MCAs submetidas as diferentes frações do látex de mangabeira, novos testes de quantificação da expressão de genes estão em andamento em nosso laboratório e ajudarão a esclarecer o potencial angiogênico das frações do látex de mangabeira.

### 4.3. Prospecção fitoquímica da fração soro

Os resultados da prospecção fitoquímica da fração soro do látex de *H. speciosa* (fração com maior atividade angiogênica) estão apresentados na Tabela 6. Por meio das reações feitas, observou-se a presença de taninos e flavonóides no soro de mangabeira. Não foi identificado no látex de mangabeira a presença de alcalóides, antraquinonas e cumarinas.

Tabela 6: Prospecção química da fração soro do látex de *H. speciosa*.

Metabólitos secundários	Reação de Caracterização	Resultados	Coloração/ Precipitado
<b>Alcalóides</b>	Reação de Bouchardat	Negativo	-
	Reação de Dragendorff	Negativo	-
	Reação de Mayer	Negativo	-
<b>Antraquinonas</b>	Reação de Borntrager	Negativo	-
<b>Cumarinas</b>	Reação com NaOH 1N	Negativo	-
<b>Flavonóides</b>	Reação de Shinoda	Positivo	Laranja
	Reação Oxalo-Bórica	Positivo	Fluorescente
	Reação com H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado	Positivo	Fluorescente
	Reação com hidróxidos alcalinos	Positivo	Amarelo escuro
	Reação com Cloreto de Alumínio	Positivo	Fluorescente
<b>Taninos</b>	Reação com Cloreto Férrico	Positivo	Verde castanha
	Reação com gelatina	Positivo	Precipitou
	Reação com Alcalóides	Positivo	Precipitou
	Reação com Sais Metálicos	Positivo	Verde escuro
	Reação com Hidróxidos Alcalinos	Positivo	Precipitou

Na caracterização de flavonóides, foram observadas mudanças na coloração das amostras testadas, as quais revelaram a presença de diferentes classes de flavonóides na fração soro do látex de mangabeira. Na reação de Shinoda, houve o aparecimento de coloração laranja, o que sugere a presença de flavonas no soro. A reação Oxalo-Bórica apresentou cor fluorescente amarelo-verde, demonstrando a existência de flavonóis na amostra. A reação com hidróxidos alcalinos resultou em coloração amarelo escuro, o que também indica a presença de flavonóis. A reação com cloreto de alumínio, por sua vez, resultou em surgimento de cor fluorescente, sugerindo a presença de flavanonas. Por fim, a reação com cloreto férrico apresentou cor verde castanho, o que confirma que o soro do látex de *H. speciosa* possui flavonóis e flavanonas.

Estudos que realizaram a prospecção química de partes da planta de *H. speciosa*, relataram a presença de metabólitos como flavonóides, alcalóides, saponinas, catequinas, proantocianidinas e taninos na casca de mangabeira (HONDA, 1990; COSTA et al., 2008; MORAES et al., 2008; LIMA NETO, 2015). Já nas folhas dessa planta foram encontrados, flavonóides, alcalóides, saponinas, esteróides, triterpenos e taninos (HONDA, 1990; LIMA NETO, 2015). A análise fitoquímica do fruto de mangaba revelou a presença de flavonóides, fenóis e taninos no extrato etanólico desse fruto (ASSUMPÇÃO et al., 2014). Marinho et al. (2011) realizaram triagens fitoquímicas no látex de *H. speciosa* e encontraram em suas amostras a presença de flavonóides e diterpenos. Assim como Marinho et al. (2011), encontrou-se neste trabalho, compostos flavonóides no soro do látex de mangabeira. No entanto, foi observada também a ocorrência de taninos nas amostras testadas.

Dentre os compostos encontrados na triagem fitoquímica realizada neste trabalho, os flavonóides destacam-se pela sua importância farmacológica por serem compostos que possuem atividade antioxidante, antiproliferativa, anti-inflamatória, antiulcerogênica, antimicrobiana (GALLEGOS-OLEA et al., 2008; GRANATO et al., 2013), antialérgica, hepatoprotetora, antitrombótica, antiviral e anticarcinogênica (MIDDLETON JUNIOR et al., 2000). Já os taninos, são compostos fenólicos que apresentam atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres, ação antifecciosa, antibacteriana, antifúngica e antiprotozoária (BESSA et al., 2013; OLIVEIRA; ALMEIDA, 2016).

O uso de substâncias naturais, tais como extratos, produtos ou partes de plantas medicinais, com a finalidade de tratar doenças na pele, como as feridas ou lesões agudas e crônicas, tem ocorrido desde a antiguidade (MOTALEB et al., 2015). Dentre os compostos presentes nessas plantas, os metabólitos secundários como alcalóides, flavonóides, taninos, dentre outros composto fenólicos, têm sido apontados como os responsáveis pelas atividades farmacológicas que essas plantas desempenham no processo de regeneração da pele (AGYEPONG et al., 2015). Algumas espécies de plantas, que foram caracterizadas quimicamente e nas quais constatou-se a presença de flavonóides, já possuem seus extratos e frações indicados para serem incorporados em produtos farmacêuticos voltados para o tratamento de doenças de pele. Dentre essas plantas, tem-se: *Eugenia spp*, da qual já foram isolados compostos flavonóides como a quercetina, rutina e hiperosídeo (ALBUQUERQUE et al., 2016), *C. officinalis* (TABATABAI-NAIENI et al., 2010) e *Copaifera sp.* (PAIVA et al., 2002), as quais apresentaram ação farmacológica em feridas contaminadas.

Os compostos fenólicos, em especial taninos e flavonóides, são relatados na literatura como compostos capazes de estimular uma rápida regeneração da pele e por desencadear

efeitos antimicrobianos. É importante ressaltar que a bioatividade de todos os metabólitos secundários está relacionada tanto com a quantidade, quanto com a qualidade destes compostos no extrato da planta, além de depender da interação entre eles (VARMA; GIRI, 2013; GHUMAN et al., 2016). No processo de cicatrização de feridas, complexos formados por compostos fenólicos e proteínas podem atuar na formação de uma película sobre a ferida que evita a desidratação pela perda de fluidos e cria uma barreira física no tecido lesado, impedindo a ocorrência de infecções geradas por micro-organismos. Além disso, essa barreira pode prevenir a ocorrência de danos químicos no tecido em regeneração (LUSEBA et al., 2007). A literatura aponta que este mecanismo de formação de uma barreira fenólico-proteica explique os efeitos antimicrobianos desses metabólitos secundários (GHUMAN et al., 2016). O complexo fenólico-proteico, formado principalmente por taninos, exerce sua atividade antimicrobiana e inibidora de enzimas, através da ligação do grupo hidroxila dos compostos fenólicos com o grupo carboxila de regiões proteicas da parede celular bacteriana, o que irá gerar o efeito protetor na ferida, e impedirá o acometimento de infecções (NCUBE; VAN STADEN, 2015).

A proteção de feridas contra micro-organismos contaminantes é uma importante etapa do processo de cicatrização de feridas, visto que a presença microbiana no local danificado pode prolongar a fase inflamatória, um evento normal da regeneração tecidual. Isso ocorre porque a presença de micro-organismos e suas toxinas na ferida pode levar ao aumento da liberação de citocinas pró-inflamatórias, aumentando a duração da inflamação. Esse prolongamento poderá fazer com que a ferida entre no estado crônico e não consiga cicatrizar. Além disso, a inflamação prolongada aumenta a disponibilidade de metaloproteases de matriz, as quais podem atuar na degradação de matriz extracelular (EDWARDS; HARDING, 2004; MENKE et al., 2007). Sem inflamação, o processo de cura não se inicia e quando essa inflamação é demasiadamente prolongada pode gerar feridas crônicas e posteriormente, cicatrizes densas e excessivas. A cicatrização de feridas, sejam elas crônicas ou agudas, representa um dos principais desafios clínicos da atualidade, além de gerar altos custos para os pacientes (GELLER et al., 2015). De acordo com Cooper et al. (2015), uma das maiores complicações desse processo é a ocorrência de uma fase inflamatória estendida, que irá interferir na progressão da ferida, na sua reorganização e por fim, na sua subsequente velocidade de re-epitelização. Frente a isso, devido à ação anti-inflamatória de flavonóides, que possibilita o encurtamento do período de inflamação, e sua ação antimicrobiana, que promove a proteção da lesão tecidual contra a ocorrência de infecções, torna esses compostos grandes candidatos para serem utilizados como princípios ativos de medicamentos voltados

para cicatrização da pele (LODHI; SINGHAI, 2013). Estudos com taninos também demonstraram que esses compostos possuem atividade antibacteriana em feridas, o que faz deles potentes agentes no combate da infecção bacteriana recorrente em feridas cutâneas (VAFI et al., 2016).

Outro cenário bastante comum durante o processo de cicatrização de feridas é a presença de microambiente hipóxico, causado pela ruptura vascular e pelo elevado consumo de oxigênio pelas células metabolicamente ativas durante a re-estruturação do tecido (TANDARA; MUSTOE, 2004). A má oxigenação dos tecidos criará uma ferida hipóxica, na qual não haverá o aporte de oxigênio necessário para sustentar todos os eventos da regeneração tecidual. Ambientes com quadros de hipóxia são acometidos pela alta liberação de radicais livres (principalmente ânions superóxidos), e necessitam da ação de antioxidantes para a extinção desses radicais livres, afim de prevenir futuros danos as células (CONNER; GRISHAM, 1996; LODHI; SINGHAI, 2013). De acordo com a literatura, em ferimentos cutâneos ocorre uma diminuição no estado antioxidante do tecido, o que o torna vulnerável ao ataque de radicais livres (SCHAFER; WERNER, 2008). Tais fatos sugerem a importância de se assegurar uma atividade antioxidante ideal durante a cicatrização de feridas. Por isso, a ação antioxidante de compostos fenólicos, como flavonóides e taninos, é indispensável para evitar a ocorrência de estresse oxidativo, o que contribuirá com a aceleração do processo regenerativo (MARTIN, 1996; ALBUQUERQUE et al., 2016).

Além de possuir atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante, os compostos flavonóides tem demonstrado ainda atuar no aumento da síntese de colágeno em tecidos lesados, além de, promover a reticulação do colágeno, diminuir a degradação de colágeno solúvel, acelerar a conversão de colágeno solúvel em insolúvel e por fim, inibir o catabolismo dessa proteína solúvel (RAO et al., 1981; INAN et al., 2006). O colágeno é uma proteína da matriz extracelular que contribui com a resistência e fechamento da ferida, por esse motivo, a deposição dessa proteína e da matriz extracelular na ferida é uma das fases mais importantes da cicatrização (WITTE; BARBUL, 1997). A influência de flavonóides na produção de colágeno durante a regeneração tecidual foi observada por Lodhi e Singhai (2013), o qual relatou a ocorrência de um incremento na deposição de colágeno e aumento significativo na taxa de contração e na epitelização de feridas cutâneas de ratos diabéticos, tratadas com a fração de flavonóides isolada da planta *Martynia annua*. Já Geethalakshmi et al. (2013), avaliou o potencial de cicatrização da fração de flavonóides da planta *Sphaeranthus amaranthoides* e observou aumento no nível de colágeno em feridas cutâneas

de ratos tratados com a fração, o que gerou uma contração mais rápida das feridas, quando comparadas ao grupo controle.

A cicatrização de feridas ainda representa uma questão médica desafiadora, a qual requer tratamentos e cuidados especializados. Muitos estudos, realizados nos últimos anos, tem apontado as potencialidades dos taninos para uso terapêutico na melhoria da regeneração de feridas e queimaduras (PARK et al., 2015; VAFI et al., 2016). Sua ação no processo de cicatrização se dá principalmente, pela sua capacidade de: atuar como quelante de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, promover uma contração mais rápida das feridas e por aumentar a proliferação de fibroblastos e de novos capilares (FERNANDEZ et al., 2002; PAWAR; TOPPO, 2012). Durante o processo de regeneração, os taninos possuem a habilidade de se ligar e precipitar proteínas dos tecidos lesados, gerando uma camada protetora sobre a ferida, favorecendo, desta forma, a ocorrência de uma cicatrização mais rápida (SPENCER et al., 1988; BARROS et al., 2012). Além disso, Li et al. (2011) observou que o extrato de taninos de *Terminalia chebula* podem atuar na regulação da expressão do gene *vegf*, gerando um aumento na quantidade de capilares neoformados durante a fase inflamatória da cicatrização e tornando mais rápida a contração da ferida. Desta forma, tanto Li et al. (2011), quanto Carneiro et al. (2016), o qual avaliou a ação angiogênica de taninos isolados de *Lafoensia pacari* em MCA de ovo fertilizado de galinha, sugerem que os taninos são capazes de promover a cicatrização de feridas por possuírem elevada propriedade angiogênica. Gu et al. (2006) também demonstra os efeitos angiogênicos desses compostos fenólicos. Os autores observaram que taninos isolados da espécie *Geum japonicum* foram capazes de regular a expressão do *vegf*, contribuindo assim, com uma neovascularização precoce no miocárdio infartado de ratos.

O desenvolvimento de fármacos para tratamento de feridas na pele é de grande interesse na comunidade científica, principalmente pelo fato da pele representar um órgão vital do ser humano, que além de ser o maior órgão do corpo, em termos de área e superfície, ela mantém contato direto com o meio externo (DZIAŁO et al., 2016). Atualmente, produtos químicos e drogas sintéticas são muito utilizados para o tratamento e cicatrização de feridas cutâneas, os quais tem demonstrado possuir limitações funcionais e efeitos colaterais. Por esse motivo, recentemente muito tem sido investigado a cerca do uso de produtos naturais e seus componentes bioativos, como fonte alternativa de medicamentos para a regeneração tecidual, os quais sejam capazes de atuar no processo inflamatório, para que este seja mais curto, e que gerem o mínimo de complicações possível durante o desenrolar do processo de cicatrização dos tecidos (BAHRAMSOLTANI et al., 2014; CORREA et al., 2017). Dentre os produtos



naturais de grande potencialidade terapêutica para cura de feridas cutâneas, encontra-se o látex de *H. speciosa*, que neste estudo demonstrou possuir uma atividade angiogênica promissora em seu soro, além de apresentar em sua composição metabólitos secundários como taninos e flavonóides, os quais são descritos na literatura como efetivos agentes capazes de acelerar o processo de regeneração tecidual.

A caracterização e isolamento de compostos bioativos de plantas representa uma das principais áreas a serem exploradas pelas ciências médicas, pois a partir desses estudos será possível o detalhamento de uma gama de benefícios terapêuticos presentes em extratos botânicos (GHUMAN et al., 2016). Métodos qualitativos, como a prospecção fitoquímica, possibilitam a realização de uma varredura inicial de baixo custo, principalmente quando se trata de espécies com potencial medicinal pouco conhecido, de perfil fitoquímico não explorado e que pertencem a biomas com ampla importância para conservação da biodiversidade existente na Terra, como é o caso do Cerrado (BESSA et al., 2013).

## 5. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi realizado o fracionamento do látex de mangabeira e os dados obtidos demonstraram que a fração soro do látex de *H. speciosa* apresentou uma significativa atividade angiogênica na membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha. Essa atividade angiogênica foi confirmada pelas análises histológica e molecular das MCAs. Além disso, a triagem fitoquímica desse soro demonstrou que o látex de *H. speciosa* possui em sua constituição flavonóides e taninos, os quais são descritos na literatura como compostos que possuem atividade antioxidante, antimicrobiana e de forte potencial angiogênico, sendo capazes de atuar na aceleração do processo de regeneração tecidual. A utilização do soro do látex de mangabeira como um biomaterial em aplicações médicas, representa uma área bastante promissora, em especial, devido a sua capacidade de estimulação natural da angiogênese e por apresentar biocompatibilidade com sistemas vivos. Além disso, a confirmação do potencial angiogênico do látex agrega valor econômico a *H. speciosa*, a qual até o presente momento, vem sendo explorada apenas pela utilização de seus frutos pela indústria alimentícia.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI, D.L.S. **Caracterização dos constituintes do látex e da borracha natural que estimulam a angiogênese**. 2009. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias de Materiais) – Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Presidente Prudente – São Paulo. 2009.
- AGYEPONG, N. et al. Antioxidant and *in vivo* wound healing activities of *Clausena anisata*. **Eur. J. Med Plant.**, v.10, n.2, p.1-8, 2015.
- ALBUQUERQUE, R.D.D.G. Wound healing activity and chemical standardization of *Eugenia pruniformis* Cambess. **Pharmacogn. Mag.**, v.12, n.48, oct-dec, 2016.
- ALMEIDA, L.M. et al. *Hancornia speciosa* latex for biomedical applications: physical and chemical properties, biocompatibility assessment and angiogenic activity. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 25, p. 2153-62, 2014.
- ALMEIDA, L.M. et al. The state-of-art in angiogenic properties of latex from different plant species. **Curr. Angiogenesis**, v. 4, p. 10-23, 2016.
- ARAÚJO, L.A. et al. Angiogenic activity of sucupira (*Pterodon emarginatus*) oil. **Sci. Med.**, v. 25, n. 2, p. 1-7, 2015.
- ARAÚJO, L.A. et al. Physicochemical/photophysical characterization and angiogenic properties of *Curcuma longa* essential oil. **An. Acad. Bras. Cienc.** (Online), v. 1, p. 1-9, 2016.
- ARAÚJO, M.M.; MASSUDA, E.T.; HYPOLITO, M.A. Anatomical and functional evaluation of tympanoplasty using a transitory natural latex biomembrane implant from the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Acta Cir. Bras.**, v. 27, n. 8, p. 566–71, 2012.
- ASSUMPÇÃO, C.F. et al. Characterization, antioxidant potential and cytotoxic study of mangaba fruits. **Cien. Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 7, p. 1297-1303, jul. 2014.
- BAHRAMSOLTANI, R.; FARZAEI, M.H.; RAHIMI, R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: an integrative review. **Arch. Dermatol. Res.**, v.306, n.7, p.601–617, 2014.
- BALABANIAN, C.A. et al. Biocompatibility of natural látex implanted into dental alveolus of rats. **J. Oral Sci.**, v. 48, p. 201–205, 2006.
- BARROS, F.; AWIKA, J.M.; ROONEY, L.W. Interaction of tannins and other sorghum phenolic compounds with starch and effects on *in vitro* starch digestibility. **J. Agric. Food. Chem.**, v.60, n.46, p.11609-11617, 2012.
- BATES, D.O.; HARPER, S.J. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial

growth factors. **Vascul. Pharmacol.**, v.39, n.(4-5), p.225-37, 2002.

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

BESSA, N.G.F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.4, supl.I, p.692-707, 2013.

BHARTI, S.; WAHANE, V.D.; KUMAR, V.L. Protective effect of *Calotropis procera* latex extracts on experimentally induced gastric ulcers in rat. **J. Ethnopharmacol.**, v.127, p.440-4, 2010.

BISCARO, F. **Estudo do efeito antiproliferativo e pró- apoptótico do látex de *Croton celtidifolius* Baill.** 2011. 99f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Florianópolis- Santa Catarina, 2011.

BOOKOUT, A. L. et al. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. **Curr. Protoc. Mol. Biol.**, Feb. 2006. doi:10.1002/0471142727.mb1508s73.

BRANDAO, M.L. et al. Evaluation of wound healing treated with latex derived from rubber trees and *Aloe Vera* extract in rats. **Acta Cir. Bra.**, v.31, n.9, p.570-577, 2016.

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

CALEY, M.P.; MARTINS, V.L.; O'TOOLE, E.A. Metalloproteinases and Wound Healing. **Adv. Wound Care**, v.4, n.4, p.225-234, 2015.

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc. Cult.*, São Paulo, v. 55, n. 3, sept. 2003. (Disponível em: <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sciarttext&pid=S000967252003000300022&lng=en&nrm=iso>). Acessado 12/10/2016.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nat. Med.**, v.9, n.6, p.653-660, 2003.

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

CARVALHO, B.R. et al. Natural latex (*Hevea brasiliensis*) mold for neovaginoplasty. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 31-35, 2008.

CERCATO, L.M. **Efeito do extrato aquoso da casca de *Hancornia speciosa* Gomes (mangabeira) sobre a obesidade induzida em camundongos.** 2015. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão/Sergipe. 2015.

CHAUDHARY, P. et al. Antiedematogenic and antioxidant properties of high molecular

- weight protein sub-fraction of *Calotropis procera* latex in rat. **J. Basic Clin. Pharm.**, v. 6, n. 2, p. 69-73, 2015.
- CONNER, E.M.; GRISHAM, M.B. Inflammation, free radicals, and antioxidants. **Nutrition.**, v.12, n.4, p.274-7, 1996.
- COOPER, R.L. et al. Modeling the effects of systemic mediators on the inflammatory phase of wound healing. **J. Theor. Biol.**, v.367, p.86–89, 2015.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v.3.
- COSTA, E.S.et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. **Phytother. Res.**, v.22, p.705–707, 2008.
- CORREA, F.R.S. et al. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFkB. **Biomed. Pharmacother.**, v.86, p.162–171, 2017.
- DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Preliminary studies on analgesic activity of latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, p. 307-311, 2000.
- DOMSALLA, A.; MELZIG, M.F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Med.**, v.74, p.699-711, 2008.
- DZIAŁO, M. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders, **Int. J. Mol. Sci.**, v.17, n.2, p.160, 2016.
- EDWARDS, R.; HARDING; K.G. Bacteria and wound healing. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v.17, p.91-96, 2004.
- ENDRINGER, D.C.et al. Evaluation of brazilian plants on cancer chemoprevention targets *in vitro*. **Phytother. Res.**, v.24, p.928–933, 2010.
- ERENO, C. et al. Latex use as an occlusive membrane for guided bone regeneration. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v.95, p.932–9, 2010.
- FARRELL, B.D.; DUSSOURD, D.E.; MITTER, C.. Escalation of plant defense: do látex and resin canals spur plant diversification? **Am. Nat.**, v.138, p.881–900, 1991.
- FERNANDEZ-ARCHE, A. et al. Topical anti-inflammatory effect of tirucallol, a triterpene isolated from *Euphorbia lactea* latex. **Phytomedicine**, v. 17, p. 146-8, 2010.
- FERNANDEZ, O. et al. Efficacy of *Rhizophora mangle* aqueous bark extract in the healing of open surgical wounds. **Fitoterapia**, v.73, p.564-568, 2002.
- FERREIRA, H.C. et al. Endothelium-dependent vasodilatation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, Germany, v.14, p.473–478, 2007a.
- FERREIRA, H.C. et al. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. **J. Ethnopharmacol.**, Copenhagen, v.109, p.161–164, 2007b.

- FERREIRA, M. et al. Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. **Braz. J. Phys.**, v.39, n.3, p.564-569, 2009.
- FLORIANO, J.F. et al. Comparative study of bone tissue accelerated regeneration by latex membranes from *Hevea brasiliensis* and *Hancornia speciosa*. **Biomed. Phys. Eng. Express**, v.2, n.4, 2016.
- FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N. Engl. J. Med.**, v.285, p.1182–1186, 1971.
- FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **J. Biol. Chem.**, v.267, n.16, p.10931-10934, jun. 1992.
- FOLKMAN, J. Fundamental concepts of the angiogenic process. **Curr. Mol. Med.**, v.3, n.7, p.643-651, 2003a.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis and apoptosis. **Semin. Cancer Biol.**, v.13, n.2, p.159-67, 2003b.
- FRADE, M.A.C. et al. The vegetal biomembrane in the healing of chronic venous ulcers. **An. Bras. Dermatol.**, v.87, n.1, p.45-51, 2012.
- GALLEGOS-OLEA, R.S. et al. Flavonóides de *Calotropis procera* R. Br. (Asclepiadaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.10, n.1, p.29-33, 2008.
- GAWCHIK, S.M. Latex allergy. **Mt. Sinai J. Med.**, v.78, n.5, p.759-72, Sep-Oct. 2011. doi: 10.1002/msj.20281.
- GELLER, F.C. et al. Evaluation of the wound healing properties of *Hancornia speciosa* leaves. **Phytother. Res.**, v.29, n.12, p.1887-93, dec. 2015.
- GHUMAN, S. et al. Antimicrobial activity, phenolic content, and cytotoxicity of medicinal plant extracts used for treating dermatological diseases and wound healing in kwazulu-natal, south africa. **Front. Pharmacol.**, v.7, p.320, 2016.
- GIANNOPOULOU, E. et al. X-Rays modulate extracellular matrix *in vivo*. **Int. J. Cancer**, v.94, n.5, p.690-698, dec. 2001.
- GOYAL, M.; NAGORI, B.P.; SASMAL, D. Wound healing activity of latex of *Euphorbia caducifolia*. **J. Ethnopharmacol.**, v.144, n.3, p.786–90, 2012.
- GRANATO, E.M. et al. Phytochemical screening of plant species *Trixis antimenorrhoea* (Schrank) Kuntze. **Rev. Bras. Farm.**, v.94, n.2, p.130-135, 2013.
- GRANDI, T.S.M. et al. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v.3, n.2, p.185-224, 1989.
- GU, X. et al. Neovascularization of ischemic myocardium by newly isolated tannins prevents cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function. **Mol. Med.**, v.12, n.11-12, p.275-83, 2006.

HELMUS, M.N.; GIBBONS, D.F.; CEBON, D. Biocompatibility: meeting a key functional requirement of next-generation medical devices. **Toxicol. Pathol.**, v.36, p.70-80, 2008.

HERCULANO, R.D. et al. Natural rubber latex used as drug delivery system in guided bone regeneration (GBR). **Mater. Res.**, v.12, n.2, p.253–256, 2009.

HONDA, N.K. et al. Estudo químico de plantas do Mato Grosso do Sul. I. Triagem fitoquímica. **R. Cient. Cult.**, UFMS, Camo Grande- MS, v.5, n.1, p.37–46, 1990.

Honda, N. et al. Optical properties of tumor tissues grown on the chorioallantoic membrane of chicken eggs: tumor model to assay of tumor response to photodynamic therapy. **J. Biomed. Opt.**, v.20, n.12, p.125001, dec. 2015.

HONORATO, S.B. **Efeito antioxidante de componentes do látex da seringueira e mangabeira sobre a degradação termo-oxidativa do poli(1,4-*cis*-isopreno) sintético.** 2005. 76f. Dissertação (Mestrado em Química Inorgânica) – Curso de Pós-graduação em Química Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - Ceará. 2005.

INAN, A. et al. The effect of purified micronized flavonoid fraction on the healing of anastomoses in the colon in rats. **Surg. Today**, v.36, p.818-822, 2006.

JACKSON, J.R. et al. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. **FASEB J.**, v.11, n.6, p.457–65, 1997.

JUNQUEIRA, N.T.V. et al. Frutíferas nativas do Cerrado: o extrativismo e a busca da domesticação. In: **XXII CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA.** 2012, Bento Gonçalves – Rio Grande do Sul.

KAHN, S.L. et al. Natural rubber latex allergy. **Dis. Moun.**, v.62, n.1, p.5-18, jan. 2016.

KONNO, K. et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant J.**, v.37, p.370-378, 2004.

KONNO, K. Plant latex and other exudates as plant defense systems: roles of various defense chemicals and proteins contained therein. **Phytochemistry**, v.72, n.13, p.1510-1530, 2011.

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

LI, K. et al. Tannin extracts from immature fruits of *Terminalia chebula* Fructus Retz. promote cutaneous wound healing in rats. **BMC Complement. Altern. Med.**, v.11, p.86, 2011.

LIMA NETO, G.A. et al. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.17, n.4, supl. 3, p.1069-1077, 2015.

LIU, C.-T. et al. *Davallia bilabiata* exhibits anti-angiogenic effect with modified MMP-2/TIMP-2 secretion and inhibited VEGF ligand/receptors expression in vascular endothelial

cells. **J. Ethnopharmacol.**, v.196, p.213–224, 2017.

LODHI, S.; SINGHAI, A.K. Wound healing effect of flavonoid rich fraction and luteolin isolated from *Martynia annua* Linn. on streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v.6, n.4, p.253-259, 2013.

LOKMAN, N.A. et al, Chick chorioallantoic membrane (cam) assay as an *in vivo* model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. **Int. J. Mol. Sci.**, v.13, n.8, p.9959–9970, 2012.

LUSEBA, D. et al. Antimicrobial, anti-inflammatory and mutagenic effects of some medicinal plants used in South Africa for treatment of wounds and retained placenta in livestock. **South Afr. J. Bot.**, v.73, n.3, p.378–383, 2007.

MALDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MALDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares-Parte II. **An. Bras. Dermatol.**, v.78, n.5, p.525-40, 2003.

MALMONGE, J.A. et al. Comparative study on technological properties of latex and natural rubber from *Harconia speciosa* Gomes and *Hevea brasiliensis*. **J. Appl. Polym. Sci.**, v.111, p.2986–2991, 2009.

MANGIERI, D. et al. Angiogenic activity of multiple myeloma endothelial cells in vivo in the chick embryo chorioallantoic membrane assay is associated to a down-regulation in the expression of endogenous endostatin. **J. Cell. Mol. Med.**, v.12, n.3, p.1023-1028, 2008.

MANJUNATHAN, R.; RAGUNATHAN, M. Chicken chorioallantoic membrane as a reliable model to evaluate osteosarcoma-an experimental approach using SaOS2 cell line. **Biol. Proced. Online**, v.17, p.1–13, 2015.

MARINHO, D.G. et al. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.135, n.2, p.530–537, 2011.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chem.**, v.113, n.4, p.1370-1376, 2009.

MARTIN, A. The use of antioxidants in healing. **Dermatol. Surg.**, v.22, n.2, p.156–160, 1996.

MARTINS, R. et al. Comparative study of bone response guided tissue regeneration technique-macroscopic evaluation, Part 1. **Full Dent. Sci.**, v.1, n.3, p.224–30, 2010.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1988.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. **Farmacognosia**. Fortaleza: UFC, 1989.

MELLO, V.J. et al. The gastric ulcer protective and healing role of cystine proteins from *Carica candamarcensis*. **Phytomedicine**, v.15, n.4, p.237–44, 2008.

MELO-REIS et al. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. **Braz. J. Biol.**, v.70, n.1, p.189-194, 2010.



- MELO-REIS et al. Potencial de cicatrização do látex da *Synadenium umbellatum* Pax (1894) em feridas limpas no dorso de ratos. **Estudos** (Goiânia. Online), v. 42, p. 481-491, 2015.
- MENDONÇA, R.J. et al. Increased vascular permeability, angiogenesis and wound healing induced by the serum of natural latex of the rubber tree *Hevea brasiliensis*. **Phytother. Res.**, v.24, n.5, p.764–768, 2010.
- MENKE, N.B. et al. Impaired wound healing. **Clin. Dermatol.**, v.25, p.19-25, 2007.
- MIDDLETON JUNIOR, E. et al. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacol. Rev.**, v.52, n.4, p.673-751, 2000.
- MORAES, P.S.P. et al. Avaliação da atividade angiogênica da solução aquosa da *Tabebuia impetiginosa* (Ipê-roxo). **EVS**, Goiânia, v.43, n.1, p.47-53, jan./mar. 2016.
- MORAES, T.M. et al. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **J. Ethnopharmacol.**, Copenhagen, v.120, n.2, 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.
- MOSTAFAIE, A.; MANSOURI, K.; NOROOZNEZHAD, A.H. Antiangiogenic activity of *Ficus carica* latex extract on human umbilical vein endothelial cells. **Yakhteh**, n.12, v.4, p.525-8, 2011.
- MOTALEB, M.A. et al. Herbal healing: an old practice for healthy living among Khumi, Marma and Tripura communities of Thanchi Upazila, Bangladesh. **European J. Med. Plants**, v.5, n.1, p.23-52, 2015.
- MOUSINHO, K.C. et al. Antitumor effect of laticifer proteins of *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel - Apocynaceae. **J. Ethnopharmacol.**, v.137, n.1, p.421-426, 2011.
- 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.
- NABOUT, J.C. et al. The impact of global climate change on the geographic distribution and sustainable harvest of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) in Brazil. **Environ. Manage.**, v.57, n.4, p.814-21, apr. 2016.
- NCUBE, B; VAN STADEN, J. Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. **Molecules**, v.20, n.7, p.12698-12731, 2015.
- NEVES, J.S. et al. Evaluation of the osteogenic potential of *Hancornia speciosa* latex in rat calvaria and its phytochemical profile. **J. Ethnopharmacol.**, v.183, p.151–158, 2016.
- NOGUEIRA, I.A. et al. Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum*

- Pax. **J. Ethnopharmacol.**, v.120, n.3, p.474-478, 2008.
- NOTHIAS-SCAGLIA, L.F. et al. LC-MS<sup>2</sup> -Based dereplication of *Euphorbia* extracts with anti-Chikungunya virus activity. **Fitoterapia**, v.105, p.202-209, 2015.
- OLIVEIRA, J.S.; COSTA-LOTUFO, L.V.; BEZERRA, D.P. *In vivo* growth inhibition of sarcoma 180 by latex protein from *Calotropis procera*. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v.382, n.2, p.139-49, 2010.
- OLIVEIRA, N.T.; ALMEIDA, S.S.M.S. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida* aublet (Apocynaceae). **Bio. Amaz.**, v.6, n.1, p.20-25, jun. 2016.
- PAIVA, L.A.F. Investigation on the wound healing activity of oleo-resin from *Copaifera langsdorffi* in rats. **Phytother. Res.**, v.16, n.8, p.737-9, 2002.
- PARENTE, L.M.L. et al. Angiogenic activity of *Calendula officinalis* flowers L. in rats. **Acta Cir. Bras.**, v.26, n.1, p.19-24, 2011.
- PARIDA, P.; BEHERA, A.; MISHRA, S.C. Classification of biomaterials used in medicine. **Int. J. Adv. Appl. Sci.**, v.1, n.3, p.31-35, 2012.
- PARK, H.H. et al. Potential wound healing activities of Galla Rhois in human fibroblasts and keratinocytes. **Am. J. Chin. Med.**, v.43, n.8, p.1625-36, 2015.
- PATEL, N.R.; GOHIL, P.P. A review on biomaterials: scope, applications & human anatomy significance. **Int. J. Emerg. Technol. Adv. Eng.**, v.2, n.4, april. 2012.
- PAWAR, R.S.; TOPPO, F.A. Plants that heal wounds. A review. **Herba Pol.**, v.58, n.1, p.47-65, 2012.
- PELENOVA. Regedem® e Biocure, Pele Nova Tecnologia S.A. Disponível na internet: **[Http://www.pelenova.com.br/site](http://www.pelenova.com.br/site)**. Acesso em 02 de junho de 2016.
- PENHAVEL, M.V.C. et al. Efeito do gel da seiva do látex da *Hevea brasiliensis* na cicatrização de lesões cutâneas agudas induzidas no dorso de ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.43, n.1, p.048-053, 2016.
- PEREIRA, A.C. et al. *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) as a potential anti-diabetic drug. **J. Ethnopharmacol.**, v.161, p.30-35, 2015.
- QUIGLEY, J.; ARMSTRONG, P. Tumor cell intravasation alu-cidated: the chick embryo opens the window. **Cell.**, v.94, p.281-284, 1998.
- RAMOS, M.V. et al. Crystal structure of an antifungal osmotin-like protein from *Calotropis procera* and its effects on *Fusarium solani* spores, as revealed by atomic force microscopy: insights into the mechanism of action. **Phytochemistry**, v.119, p.5-18, 2015.
- RAMOS, M.V. et al. The defensive role of latex in plants: detrimental effects on insects. **Arthropod Plant Interact.**, v.4, n.1, p.57-67, 2010.

RAO, C.N.; RAO, V.H.; STEINMANN, B. Influence of bioflavonoids on the collagen metabolism in rats with adjuvant induced arthritis. **Ital. J. Biochem.**, v.30, n.1, p.54–62, 1981.

RAULF, M. The latex story. **Chem. Immunol. Allergy**, v.100, p.248-255, 2014.

REBOUÇAS, S.O. et al. The antiangiogenic activity of látex from *Himatanthus articulatus*. **Braz. J. Pharmacogn.**, v.22, n.2, p.389-396, 2012.

RIBATTI, D. et al. Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis *in vivo*. **Anat. Rec.**, n.264, p.317-324, 2001.

RIBATTI, D. et al. Erythropoietin is involved in angiogenesis in human primary melanoma. **Int. J. Exp. Pathol.**, v.91, p.495–499, 2010.

RIBATTI, D. Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model. **Methods Mol. Biol.**, v.843, p.47-57, 2012.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. **Mech. Dev.**, v.141, p.70-7, may. 2016.

RODRIGUES, A.G.; AMARAL, A.C.F. Aspectos sobre o desenvolvimento da fitoterapia. In: **Ministério da Saúde. Práticas integráticas e complementares: Plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. Brasília: Ministério da Saúde. p. 13-23. 2012.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais do domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Cienc. Agrotec.**, Lavras, v.25, n.1, p.102-123, jan./fev. 2001.

ROSA, M.E.C.; NAVES, R.V.; OLIVEIRA JUNIOR, J.P. Produção e crescimento de mudas de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomez) em diferentes substratos. **Pesqui. Agropecu. Trop.**, v.35, n.2, p.65-70, 2005.

SABINO, F.; KELLER, U.A.D. Matrix metalloproteinases in impaired wound healing. **J. Metalloproteinases Med.**, v.2, p.1-8. 2015.

SACCARO JÚNIOR, N.L. **A regulamentação de acesso a recursos genéticos e repartição de benefícios: disputas dentro e fora do Brasil**. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada: Brasília, 2011.

SCHAFFER, M.; WERNER, S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. **Pharmacol. Res.**, v.58, n.2, p.165-171, 2008.

SALEEM, U. et al. Evaluation of anti-angiogenic activity of latex and extracts of *Euphorbia helioscopia* using chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Int. J. Agric. Biol.**, v.17, n.2, p.339-344, 2015.

SAMKOE, K.S.; CRAMB, D.T. Application of an ex ovo chicken chorioallantoic membrane model for two-photon excitation photodynamic therapy of age-related macular degeneration, **J. Biomed. Opt.**, v.8, n.3, p.410–417, 2003.

SAMPAIO, R.B. et al. Rabbit retinal neovascularization induced by latex angiogenic-derived fraction: an experimental model. **Curr. Eye Res.**, London, v.35, n.1, p.56-62, 2010.

SANTOS, R.M. et al. Pyrolysis of mangaba seed: production and characterization of bio-oil. **Bioresour. Technol.**, v.196, p.43-8, 2015.

SAWYER, D. Climate change, biofuels and eco-social impacts in the Brazilian Amazon and Cerrado. **Philos. Trans. R. Soc. B.**, v.363, p.1747–1752, 2008.

SEPPÄLÄ, U. et al. IgE reactivity to patatin-like latex allergen, Hev b 7, and to patatin of potato tuber, sol t 1, in adults and children allergic to natural rubber latex. **Allergy**, v.55, n.3, p.266-273, 2000.

SILVA, C.G. et al. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **J. Ethnopharmacol.**, Copenhagen, v.137, n.1, p.709-711, 2011.

SILVA, G.C. et al. Potent antihypertensive effect of *Hancornia speciosa* leaves extract. **Phytomedicine**, v.23, n.2, p.214–219, feb. 2016.

SILVA JUNIOR, J.F. A cultura da mangaba. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal, v.26, n.1, apr. 2004.

SILVA, M. A. B. et al. Ethnobotanical survey of plants used as anti-hyperlipidemic and anorexigenic by the population of Nova Xavantina-MT, Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, Curitiba, v.20, n.4, p.549-562, aug./sept. 2010.

SILVA, S.M.C. **Caracterização agrônômica de variedades botânicas de *Hancornia speciosa* Gomes do Cerrado.** 2013. 170f. Tese (Doutorado em agronomia) - Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia- Goiás, 2013.

SLATER, J.E. et al. Identification, cloning and sequence of a major allergen (Hev b 5) from natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). **J. Biol. Chem.**, v.271, n.41, p.25394, 1996.

SMITH-HALL, C.; LARSEN, H.O.; POULIOT, M. People, plants and health: a conceptual framework for plant consumption. **J. Ethnobiol. Ethnomed.**, v.8, p.43, 2012.

SOARES, P.M. et al. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.99, p.125-129, 2005.

SOUZA, V.A.B. Perspectivas do melhoramento de espécies nativas do nordeste brasileiro. In: Congresso brasileiro de melhoramento genético de plantas, 1, 2001, Goiânia. Resumo 25, Embrapa Meio-Norte, Teresina – PI, 2001.

SPENCER, C.M. et al. Polyphenol complexation - somethoughts and observations. **Phytochemistry**, v.27, n.8, p.2397-2409, 1988.

STETLER-STEVENSON, W.G. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention. **J. Clin. Investig.**, v.103, p.1237–1241, 1999.

SUNDERASAN, E. et al. Latex B-serum b-1,3-glucanase (Hev b II) and a component of the microhelix (Hev b IV) are major latex allergens. **J. Nat. Rubber Res.**, v.10, p.82-89, 1995.

TABATABAI-NAIENI, A. Effects of topical application of *Calendula officinalis* gel on collagen and hydroxyproline content of skin in rats. **Comp. Clin. Path.**; n.21, p.253-7, 2010.

TANDARA, A.A.; MUSTOE, T.A. Oxygen in wound healing- more than a nutrient. **World J. Surg.**, v.28, p.294-300, 2004.

TUFAN, A.C.; SATIROGLU-TUFAN, N.L. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model system for the study of tumor angiogenesis, invasion and development of anti-angiogenic agents. **Curr. Cancer Drug Targets**, v.5, n.4, p.249-266, 2005.

YEANG, H.Y. et al. The 14.6 kD (REF, Hev b 1) and 24 kD (Hev b 3) rubber particle proteins are recognized by IgE from spina bifida patients with latex allergy. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.98, n.3, p.628-639, 1996.

YEANG, H.Y. et al. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods.**, v.27, n.1, p.32-45, may. 2002.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. 1ª ed. Chapecó: Ed. Argos, 2001.

WIEGAND, C.; HIPLER, U.C. Methods for the measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration processes. **Krankenaushyg Interdiszip.**, v.3, p.1863–5245, 2008.

WILTING, J.; CHRIST, B.; BOKELOH, M. A modified chorioallantoic membrane (CAM) assay for qualitative and quantitative study of growth factors. **Anat. Embryol.**, v.183, n.3, p.259-271, 1991.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg. Clin. North Am.**, v.77, n.3, p.509–28, 1997.

WU, M.; MCINTOSH, J.; LIU, J. Current prevalence rate of latex allergy: Why it remains a problem? **J. Occup. Health**, v.58, n.2, p.138-144, 2016.

VAFI, F. et al. Burn wound healing activity of *Lythrum salicaria* L. and *Hypericum scabrum* L. **Wounds**, v.28, n.12, 2016.

VALDES, T.I.; KREUTZER, D.; MOUSSY, F. The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.62, n.2, p.273-82, nov. 2002.

VARGAS, A. et al. The chick embryo and its chorioallantoic membrane (CAM) for the in vivo evaluation of drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.59, n.11, p.1162-76, 2007.

VARMA, S.B.; GIRI, SP. Study of wound healing activity of *Tectona grandis* Linn. leaf extract on rats. **Anc. Sci. Life.**, v.32, n.4, p.241-4, 2013.

VIEIRA, F.R. et al. **Frutas nativas da região Centro-Oeste**. Brasília/DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. 320 p.

ZIJLSTRA, A. et al. Proangiogenic role of neutrophil-like inflammatory heterophils during neovascularization induced by growth factors and human tumor cells. **Blood**, v.107, n.1, p.317-327, 2006.

ZEUGOLIS, D.L.; PANDIT, A. Biofunctional biomaterials – the next frontier. **Bioconjugate Chem.**, v.26, n.7, p.1157–1157, 2015.

## 7. APÊNDICES

### APÊNDICE A: PASSO A PASSO GIMP E IMAGEJ

#### ➤ Preparo da imagem: software Gimp:

- 1) Abrir a imagem.
- 2) Clicar botão direito na imagem → Filtros → Desfocar → Desfocar gaussiana  
→ Horizontal = 6 e Vertical = 4
- 3) Clicar botão direito na imagem → Cores → Automático → Esticar contraste
- 4) Clicar botão direito na imagem → Filtros → Realçar → Aguçar → Acuidade=90
- 5) Clicar botão direito na imagem → Filtros → Desfocar → Desfocar gaussiana  
→ Horizontal = 3 e Vertical = 3
- 6) Arquivo → Exportar como... → formato .bmp ( bitmap)

#### ➤ Quantificação da área percentual de vascularização: ImageJ:

- 1) File → Open
- 2) Process → Subtract background... → 50 e Ok
- 3) Image → Type → Hsb stack
- 4) Image → Stacks → Stack to images
- 5) Image → Adjust → Brightness/Contrast → Auto (clicar 4 vezes)
- 6) Image → Adjust → Threshold → 0 / 234
- 7) Analyze → Analyze particles:
  - a. Size (pixel<sup>2</sup>): 0 – Infinity
  - b. Circularity: 0.00 – 1.00
  - c. Show: Nothing
  - d.  Display results
  - e.  Summarize
  - f. Click OK

## APÊNDICE B: ETAPAS DO PROCEDIMENTO HISTOLÓGICO

O procedimento histológico iniciou-se com a formação dos blocos histológicos contendo as MCAs. Para isso, as MCAs foram primeiramente fixadas em formaldeído tamponado 10%, durante 24 h. Posteriormente, as MCAs foram desidratadas ao passarem por uma bateria de álcool absoluto. Tais membranas permaneceram imersas por 1 h em cada uma das quatro cubas que continham álcool absoluto. Após desidratadas, as MCAs foram diafanizadas ficando 1 h em cada uma das três soluções de xilol utilizadas, a fim de se realizar a retirada do álcool do tecido. Em seguida, foi realizada a etapa de impregnação das MCAs com parafina e retirada do xilol. Desta forma, as membranas foram colocadas em parafina durante 30 min, passando para outras duas soluções de parafina durante 45 min cada. Por fim, com o auxílio de caixinhas de papel, as MCAs foram incluídas em parafina para realização do corte histológico em micrótomo. Após os blocos serem seccionados, os cortes das membranas (de 5 µm) foram fixados em lâminas.

As lâminas confeccionadas foram coradas com os corantes hematoxilina-eosina (HE). Para isso, as lâminas foram colocadas, primeiramente, em estufa por 15 min, para derretimento da parafina. Depois, com o auxílio de berços de vidro, as lâminas permaneceram 60 min em quatro soluções de xilol (15 min em cada solução). Para retirada desse xilol, tais lâminas foram mergulhadas em quatro soluções de álcool absoluto (2 min em cada solução). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 4 min. Em seguida, iniciou-se a coloração em solução de hematoxilina, na qual as lâminas permaneceram durante 4 min e depois foram lavadas em água corrente por 8 min. Já na eosina, as lâminas permaneceram imersas por 3 min e depois foram mergulhadas em três soluções de álcool absoluto (5 mergulhos em cada solução), permanecendo em uma quarta solução de álcool por 2 min. Para retirada do excesso de álcool, as lâminas foram, então, colocadas em 3 soluções de xilol, durante 2 min em cada. Após realização dessas etapas, a montagem final das lâminas foi realizada colocando-se uma gota de Entellan (Merck Millipore®) em lâminulas, as quais foram colocadas sobre o corte presente em cada lâmina. Por fim, as lâminas confeccionadas foram deixadas em temperatura ambiente durante 24 h para secagem e posterior visualização no microscópio óptico.



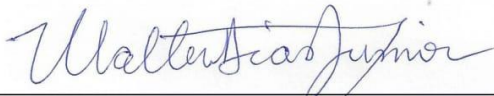
## 8. ANEXOS

## ANEXO I: PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - UEG



Anápolis, 05 de Dezembro de 2016.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO  
DE PENDÊNCIA DO PROTOCOLO N°. 007/2016**

<b>I - Identificação:</b>
<b>1. Título do projeto:</b> Avaliação da atividade angiogênica de frações do látex de mangabeira e do extrato de folhas de pacari
<b>2. Pesquisador Responsável:</b> Luciane Madureira de Almeida
<b>3. Unidade/Órgão do pesquisador:</b> UEG Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Henrique Santillo
<b>4. Pesquisadores Participantes:</b> Pablo José Gonçalves; Elisa Flávia Luiz Cardoso Bailão; Patrícia D'Abadia; Nathan Carvalho da Silva
<b>5. Unidade onde será realizado o projeto:</b> Laboratório de Biotecnologia do Campus Anápolis – CET
<b>6. Data de apresentação a CEUA:</b> 14/09/2016
<b>7. Data de Atendimento das Pendências:</b> 05/12/2016
<b>II - Parecer da CEUA:</b>
<p>Informamos que a <i>Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA</i> da Universidade Estadual de Goiás, após análise das adequações solicitadas, considerou <b>APROVADO</b>, o projeto acima referido, o qual foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes, smj dessa Comissão.</p> <p>O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UEG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) após sua conclusão. Reiteramos a importância deste Parecer Substantiado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PrP-UEG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para <b>CONCLUSÃO EM 30 DE DEZEMBRO DE 2018.</b></p>
<b>VI - Data da reunião:</b>
Reunião realizada no dia: 05/12/2016

<b>Prof. Dr. Walter Dias Júnior</b> Coordenador da CEUA/UEG