

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS DE IPAMERI
MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL
ANGIOGÊNICO DO LÁTEX DE
PINHÃO MANSO**

FABRICIO ALVES FERREIRA

**Ipameri-GO
2015**

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

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL ANGIOGÊNICO DO LÁTEX DE PINHÃO MANSO

Orientadora Prof^ª Dr^ª Luciane Madureira de Almeida

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

Ipameri - Goiás
2015

Ferreira, Fabrício Alves.

Avaliação da toxicidade e do potencial angiogênico do látex de pinhão manso / Fabricio Alves Ferreira. - 2015.
33f. il.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Madureira de Almeida.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Goiás, 2015.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE IPAMERI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM PRODUÇÃO VEGETAL

ATA DE DEFESA DA DISSERTAÇÃO – M.Sc

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL

REALIZADA EM: vinte e cinco dias do mês de fevereiro de dois mil e quinze

PROGRAMA DE: Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Produção Vegetal

CANDIDATO: Fabricio Alves Ferreira

BANCA EXAMINADORA:

1. Profa. Dra. Luciane Madureira de Almeida
2. Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis
3. Prof. Dr. Fábio Santos Matos

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: “AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL ANGIOGÊNICO DO LÁTEX DE PINHÃO MANSO”

LOCAL: Na sala de aula do mestrado na Universidade Estadual de Goiás – Câmpus Ipameri-GO

HORÁRIO DE INÍCIO: às treze horas em sessão pública, após exposição de cerca de quarenta minutos, concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, os examinadores deram o parecer final de:

APROVADO (X)

REPROVADO ()

Foi concedido um prazo de 30 dias, para o candidato efetuar as correções sugeridas pela Comissão Examinadora e apresentar o trabalho em sua redação definitiva, sob pena de não expedição do Diploma e Multa. Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca, e pela candidata.

Ipameri, 25 de fevereiro de 2015.

Banca Examinadora: Luciane Madureira de Almeida

Paulo Roberto de Melo Reis

Candidato: Fabricio Alves Ferreira

Dedicatória

À Deus que me proporcionou ter minha família e meus amigos... pessoas que levo guardadas em meu coração!

Agradecimentos

À Universidade Estadual de Goiás pela oportunidade de participar de um programa de pós-graduação, nível mestrado, na cidade de Ipameri!

Aos docentes da UEG em Ipameri, tanto do programa de pós-graduação em produção vegetal quanto da graduação em agronomia... Em especial aos professores doutores Fábio, Daniel, Ednaldo, Ney e Alcione!

A minha orientadora, profa. Dra. Luciane Madureira de Almeida pelo exemplo tanto profissional e acadêmico, quanto pessoal... Quantas coisas eu poderia ter aprendido com seus conselhos!

Aos meus pais, Isaias e Eurípedes, e aos meus filhos, Pedro Manoel e João Vitor, pela compreensão, amor, carinho e apoio nas dificuldades!

A todos os funcionários e pessoas que trabalham na UEG campus de Ipameri ... no laboratório (Josi e Maria), na secretaria do mestrado (Cida), ao pessoal da limpeza (Cecília), na copiadora (Angela) e da bibliotecas (Carla e Karla...rsrs), na cantina (sr. Jaci e esposa)...a todos meu muito obrigado!

Aos amigos que fiz e que levo pra sempre...Willany Formiga, Chamila, Lígia, Helen, Rafael Beneti, Angelina, Tiago, Thaysa Naia, Pollykennya, Daniela, João Paulo, Lívia e a 25 turma de agronomia...

À FAPEG pela concessão da bolsa que me trouxe paz e tranquilidade num momento difícil e importante!

A todos os funcionários do colégio Aprov, tanto em Ipameri quanto em Catalão pela amizade e oportunidade!

A todos que de alguma forma me ajudaram a concluir essa etapa, não apenas da minha formação acadêmica mas de minha vida!

Meus sinceros agradecimentos...

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE SIGLAS OU ABREVIACÕES	
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. BIOMATERIAIS.....	01
1.2. AVALIAÇÃO DE BIOCOMPATIBILIDADE.....	02
1.2.1. TESTE DE TOXICIDADE, CITOTOXICIDADE E GENOTOCIXIDADE COM <i>Allium cepa</i>	03
1.3. AVALIAÇÃO DE BIOFUNCIONALIDADE.....	03
1.3.1. ANGIOGÊNESE E ANTIANGIOGÊNESE.....	04
1.3.2. ENSAIO ANGIOGÊNICO EM MEMBRANAS CORIOALANTÓIDE DE <i>Gallus gallus domesticus</i>	05
1.4. BIOMATERIAIS E PLANTAS MEDICINAIS.....	05
1.5. PINHÃO MANSO.....	06
1.5.1. CENTRO DE ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO.....	06
1.5.2. DESCRIÇÃO BOTÂNICA.....	07
2. OBJETIVOS.....	09
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....	09
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	09
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1. OBTENÇÃO DO LÁTEX DE <i>Jatropha curcas</i>	10
3.2. TESTES COM <i>Allium cepa</i>	10
3.2.1. TESTE DE TOXICIDADE.....	11
3.2.2. TESTE DE GENOTOXICIDADE.....	11
3.2.2.1. PREPARO E ANÁLISES DAS LÂMINAS.....	11
3.2.2.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	12
3.2.3. TESTE DE CITOTOXICIDADE.....	12
3.3. TESTE PARA AVALIAR POTENCIAL ANGIOGÊNICO.....	12
3.3.1. OBTENÇÃO DOS OVOS FERTILIZADOS.....	12

3.3.2. AGENTES QUÍMICOS E SOLUÇÕES.....	12
3.3.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	13
3.3.4. OBTENÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS IMAGENS.....	13
3.3.5. ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	13
4. RESULTADOS.....	14
4.1. TESTES DE TOXICIDADE, CITO E GENOTOXICIDADE COM <i>Allium cepa</i>	14
4.1.1. TOXICIDADE.....	14
4.1.2. CITOTOXICIDADE.....	15
4.1.3. GENOTOXICIDADE.....	16
4.2. TESTE DE POTENCIAL ANGIOGÊNICO.....	17
4.2.1. AVALIAÇÃO DE VASCULARIZAÇÃO DAS CAM POR TRATAMENTO DE IMAGEM.....	17
4.2.2. AVALIAÇÃO DO PROCESSO ANGIOGÊNICO EM ENSAIO HISTOLÓGICO.....	17
5. CONCLUSÃO.....	18
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	19

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia do cariótipo de *Allium cepa* 02
- Figura 2.** Esquema ilustrativo demonstrando os processos angiogênicos de brotamento e de intussuscepção..... 04
- Figura 3.** Imagem com desenho representando táxon de *J. curcas*, apresentando: folhas, inflorescência e frutos..... 08
- Figura 4.** Foto digital destacando o bulbo, caule e, com setas destacando as pontas das raízes de *Allium cepa* alteradas, para tratamento com látex de pinhão manso a 5%..... 14
- Figura 5.** Fotografias de células das raízes de cebola em diferentes concentrações de látex de pinhão manso com aumento de 100x. **A:** células na concentração de 0,1% com ocorrência de cromossomos condensados e atraso no fuso mitótico; **B:** células na concentração de 0,1% com anomalia de cromossomos perdidos; **C:** células na concentração de 0,5% com ocorrência de cromossomos pegajosos; **D:** células na concentração de 0,5% com anomalia de pontes anafásicas; **E e F:** células na concentração de 0,1% evidenciando micronúcleos 18
- Figura 6.** Imagens de membrana corioalantóide (CAM) de ovos embrionados de galinha nos tratamentos com látex de pinhão manso nas concentrações: A (25%), B (50%), C (100%), e dos controles: D (Dexametasona, controle inibidor), E (Água, controle negativo) e F (Regederm[®], controle positivo). Setas indicando ocorrência de falhas na vascularização..... 19
- Figura 7.** Imagens histológicas dos tratamentos: A-Látex diluído a 25%, B-Látex diluído a 50%, C-Látex Puro, D-Dexametasona, E-Água, F-Regederm[®]. Setas cheias indicam a ocorrência de elementos inflamatórios nos diferentes tratamentos, enquanto de as setas tracejadas evidenciam vasos neoformados..... 23

Lista de Tabelas

Tabela 1. Taxa e média de crescimento da raiz de <i>A. cepa</i> , por bulbo, com desvio padrão, para controle negativo e tratamentos em diferentes concentrações de látex de <i>J. curcas</i>	15
Tabela 2. Análise de lâminas, teste com <i>Allium cepa</i> , para a avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade do látex de pinhão manso	16
Tabela 3. Porcentagem e média de vascularização de membrana corioalantóide (CAM), com desvio padrão, em relação aos tratamentos com: Látex de <i>J. curcas</i> nas concentrações 100%, 50% e 25%, água destilada, dexametasona e Regederm®	20
Tabela 4. Dados de análise estatística de CAM nos respectivos tratamentos apresentados em porcentagem. Médias discriminadas segundo o teste T de Bonferroni	24

Lista de Siglas e Abreviações

A. cepa – *Allium cepa*

ACM – anomalias de ciclo mitótico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CAM – membrana corioalantóide de ovos embrionados.

Carnoy – Solução 3:1 de etanol absoluto e ácido glacial acético

E. turicalli – *Euphorbia turicalli*

HCl – ácido clorídrico

HE – solução de hematoxilina e eosina

IM – índice mitótico

ISO – International Organization for Standardization

J. curcas – *Jatropha curcas* L.

M – micronúcleo

S. umbellatum – *Synadenium umbellatum*

Teste T – teste estatístico Student

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL ANGIOGÊNICO DO LÁTEX DE PINHÃO MANSO

RESUMO

Grande parte das inovações tecnológicas nas áreas biomédicas e na biotecnologia aplicada à área da saúde decorre do uso de biomateriais. Embora milhares de plantas apresentem potencial valor terapêutico, pouco mais de 15% destas espécies apresentam resultados cientificamente comprovados. Em relação às plantas lactíferas, é estimado que 12 a 35 mil espécies apresente potencial farmacológico praticamente desconhecido. No Brasil o uso de plantas do gênero *Jatropha*, na medicina popular, se encontra inserido em diferentes procedimentos, mas além do uso na medicina popular existem trabalhos científicos que comprovam o potencial anticancerígeno, antibacteriano e anti-inflamatório de *Jatropha curcas*, espécie da família das Euphorbiaceae. O presente trabalho objetivou avaliar a capacidade tóxica, citotóxica e genotóxica (bioteste com *Allium cepa*), além do potencial angiogênico (ensaio com membranas corioalantóide de ovo embrionado de galinha), do látex de pinhão manso em diferentes concentrações. Nos ensaios de toxicidade, as concentrações foram de 0,1%, 0,5% e de 1%, sendo comparadas ao controle negativo (água destilada) e, nos teste de cito e genotoxicidade, comparadas também ao controle positivo (azida sódica 2g/L). Os resultados obtidos evidenciam a capacidade do látex mesmo em pequenas concentrações de alterar os padrões de normalidade no funcionamento celular, tanto a nível macroscópico (toxicidade) quanto microscópico (citotoxicidade e genotoxicidade). Em relação ao potencial angiogênico o ensaio realizado utilizou concentrações maiores, 25%, 50% e látex puro, obtendo resultado semelhante ao controle inibitório tanto na avaliação de imagem, com redução da rede vascular, quanto no ensaio histológico, na ocorrência de fatores como hiperemia, presença de elementos inflamatórios e neovascularização, o que evidencia o potencial antiangiogênico do látex de pinhão manso.

PALAVRAS CHAVE: Mutagenicidade; biomaterial; potencial farmacológico; bioensaios.

ABSTRACT

Much of the technological innovations in biomedical areas and biotechnology applied to health related to the use of biomaterials. Although thousands of plants with potential therapeutic value, just over 15% of these species are scientifically proven results. Regarding lactíferas plants, an estimated 12 to 35 thousand species present virtually unknown pharmacological potential. In Brazil the use of *Jatropha* genus plants in folk medicine, is inserted in different procedures, but in addition to use in folk medicine there are scientific studies that prove the potential anticancer, antibacterial and anti-inflammatory *Jatropha curcas* of, family kind of Euphorbiaceae. This study aimed to evaluate the toxic capacity, cytotoxic and genotoxic (bioassay with *Allium cepa*), and the potential angiogenic (test with membranes embryonated chicken egg chorioallantoic) of *Jatropha* latex in different concentrations. In toxicity tests, concentrations were 0.1%, 0.5% and 1% and compared to negative control (distilled water) and, in the cyto- and genotoxicity tests also compared to the positive control (sodium azide 2g/L). The results show the latex capacity even in small concentrations to alter the normal range in cell function, both the macroscopic level (toxicity) and microscopic (cytotoxicity and genotoxicity). Regarding the potential angiogenic the run test used higher concentrations, 25%, 50% and pure latex, obtaining similar results to inhibitory control both the imaging evaluation, with reduced vasculature, as the histological test, the occurrence of factors such as hyperemia , presence of inflammatory cells and neovascularization, which shows the anti-angiogenic potential of *Jatropha* latex.

Key-words: mutagenicity; biomaterial; pharmacological potential; bioassays

1. INTRODUÇÃO

1.1 BIOMATERIAIS

Grande parte das inovações na área biomédica e na biotecnologia aplicada à área da saúde decorre do uso de biomateriais (MITRAGOTRI e LAHANN, 2009). Segundo Henche (2006), qualquer material não vivo que tenha a capacidade de interagir com o organismo vivo, restaurando funções comprometidas e reparando perdas teciduais pode ser classificado como biomaterial. Porém, essa definição é acrescida a outra importante característica dos biomateriais que é a condição de neutralidade ou de inércia em relação ao organismo receptor, prevenindo ou minimizando reações teciduais indesejáveis, associado a capacidade de não gerar produtos nocivos em sua degradação (CAO e WANG, 2009).

Hoje com o incremento de novos compostos e tecnologias é possível o desenvolvimento de biomateriais com a capacidade de interagir com o organismo receptor sem causar efeito tóxico (biocompatibilidade), além de apresentar ação no restabelecimento de determinada função específica para o organismo, característica conhecida como biofuncionalidade (RATNER, 2009).

De uma forma geral, pode-se definir biocompatibilidade como a característica de um material em promover uma ação específica para determinada aplicação, sem causar dano ao tecido ou resposta imunológica indesejável, podendo desta forma permanecer por um grande tempo em função bioativa (MAIA et al., 2010). Já a biofuncionalidade está relacionada às características físicas do biomaterial, sendo consideradas, entre outras coisas, às propriedades mecânicas, elétricas, térmicas, ótica e deteriorativa do material na função de substituir parte lesionada do tecido (ORÉFICE et al., 2006).

Dessa forma biomateriais biocompatíveis e biofuncionais interagem com o organismo de forma propositiva, não ocasionando reação de toxicidade, processo alérgico, inflamatório ou alteração de fundo mutagênico (WIEGAND e HIPLER, 2008; KAO et al., 2011). No Brasil, a avaliação desta capacidade propositiva do biomaterial deve apresentar resultados dentro de parâmetros definidos por normas e regras regulamentadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), além de padrões internacionais (ISO 10993-3 e 10993-5).

Assim, um produto para ser empregado na área médica, seja fármaco ou produto terapêutico, deve ser submetido a testes que avaliem entre outras características a biocompatibilidade e biofuncionalidade.

1.2 AVALIAÇÃO DE BIOCOMPATIBILIDADE

Existem variadas metodologias para se avaliar a biocompatibilidade de um produto. Algumas dessas metodologias utilizam as plantas superiores em bioensaios para avaliar a capacidade de uma substância em promover danos à viabilidade celular ou material genético de outros organismos eucariontes (FERNANDES et al., 2007). Uma metodologia amplamente reconhecida e aceita internacionalmente como bioindicador do potencial de citotoxicidade e genotoxicidade *in vivo* de uma substância é o teste com a cebola (*Allium cepa*).

O teste com *A. cepa* apresenta na praticidade e facilidade de execução algumas de suas qualidades, sendo um dos testes mais antigos relatados na literatura, com protocolo de execução padronizado ainda em 1985 por Fiskejo (LUCIO NETO, 2011). É considerado um dos melhores ensaios comumente utilizado devido ao fato da espécie *A. cepa* apresentar cromossomos de fácil visualização e em número reduzido (LEME e MARIN-MORALES, 2009), conforme apresentado na Figura 1.

Essas qualidades contribuíram para que o teste com *A. cepa* fosse reconhecido e validado pelo Programa Internacional de Segurança Química e pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (BAGATINI et al., 2007). Além disso, esse ensaio apresenta alta sensibilidade e boa correlação com outros sistemas testes conduzida em animais (TKALEC et al., 2009; LEME e MARIN-MORALES, 2009; PORTIS et al., 2011).

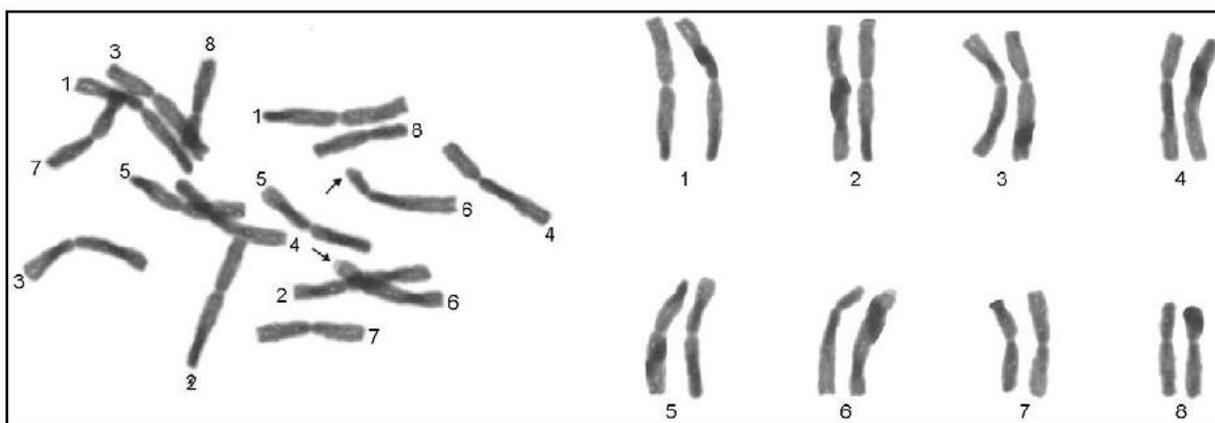


Figura 1. Fotomicrografia do cariótipo de *Allium cepa* ($2n=16$). Numeração indicando pares de cromossomos (Leme e Marin-Morales, 2009).

1.2.1 TESTE DE TOXICIDADE, CITOTOXICIDADE E GENOTOCIXIDADE COM *A. cepa*

Segundo Herrero et al. (2012) o teste com *A. cepa*, além da alta sensibilidade e da relação custo-benefício, permite dois parâmetros de avaliação distintas, a macroscópicas e a microscópicas.

A avaliação macroscópica esta fundamentada em parâmetros observados em relação ao crescimento da raiz e alterações nos padrões de normalidade, como a ocorrência de raízes torcidas. Outras alterações nos padrões esperados de normalidade também configuram potencial de toxicidade da substância avaliada, como a ocorrência de tumores (CHUCIARA et al., 2012).

A avaliação microscópica está diretamente associada ao nível celular, permitindo à análise da citotoxicidade e da genotoxicidade causadas por determinada substância. A avaliação microscópica de citotoxicidade considera como parâmetro o índice mitótico (IM), ou seja, a quantidade de células que estão em processo de mitose, no ciclo celular, permitindo inferir sobre a taxa de divisão celular das células meristemáticas presentes nas raízes de *A. cepa*. Para Panda et al. (2005) alterações no IM que levem a uma diminuição igual ou maior que 50% em relação ao controle negativo, permite determinar o potencial de citotoxicidade de uma substância, uma vez que esse percentual reduzido tanto pode ser interpretado com consequência de morte celular como possível atraso no movimento de proliferação celular.

A avaliação microscópica da genotoxicidade considera a ocorrência de aberrações cromossômicas, tais como: pontes cromossômicas, cromossomos pegajosos, atrasos ou perdas cromossômicas e formação de micronúcleos. Essas alterações seriam parâmetros importantes para se determinar o potencial genotóxico de uma substância (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

1.3 AVALIAÇÃO DE BIOFUNCIONALIDADE

A biofuncionalidade pode ser avaliada de diferentes formas, sendo o potencial angiogênico uma característica positiva em um biomaterial (SIRITIENTONG et al., 2014). A ação angiogênica pode ser evidenciada pela formação de novos vasos sanguíneos, constituindo um fator fundamental para a nutrição, desenvolvimento e maturação do tecido onde ocorre este processo (FREITAS et al., 2009; PAVLETIC, 2010).

O conhecimento relacionado à ação angiogênica é importante quando se refere à regeneração de tecidos lesionados, seja por ferimentos ou queimaduras, ou ainda na proliferação de tumores cancerígenos, que induzem a formação de uma grande rede vascularizada própria (HOSGOOD, 2006; PAVLETIC, 2010). Qualquer substância que promova ou que minimize o processo angiogênico apresenta considerável potencial terapêutico.

1.3.1 ANGIOGÊNESE E ANTIANGIOGÊNESE

Angiogênese é um termo comumente empregado para se referir à formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes (STOCKMANN et al., 2014). Hunter, em 1787, descreveu o crescimento de vasos sanguíneos em analogia a galhos de árvores, sendo o pioneiro a usar o termo angiogênese (OLIVEIRA et al., 2010). Esse processo pode ser entendido como resposta à necessidade de se levar nutrientes e oxigênio às células onde ocorrem crescimento e regeneração tecidual e eliminar restos catabólitos (BERGERS e BENJAMIN, 2003). Desta forma, a angiogênese é um processo essencial para o desenvolvimento dos tecidos e para a manutenção da homeostase no organismo, estando presente em períodos como desenvolvimento embrionário e na idade adulta durante os processos inflamatórios, sendo uma resposta controlada e com duração limitada (FOLKMAN, 2007).

Em relação ao crescimento celular o processo angiogênico pode ocorrer de duas formas distintas – brotamento ou intussuscepção (Figura 2), sendo que no caso de angiogênese por brotamento, o processo ocorre de forma invasiva, preenchendo espaços entre os vasos sanguíneos já formados (OLIVEIRA, 2010). Esse processo ocorre, por exemplo, em processos de cicatrização, através da migração de células endoteliais provenientes de um vaso pré-existente. Ainda segundo Oliveira (2010), o processo angiogênico por brotamento acontece de forma relativamente lenta, pois está diretamente associado à atuação das células endoteliais liberadas no meio extracelular, enquanto no processo por intussuscepção, ocorre da formação de um septo longitudinal em um capilar sanguíneo, originando a formação de dois capilares.

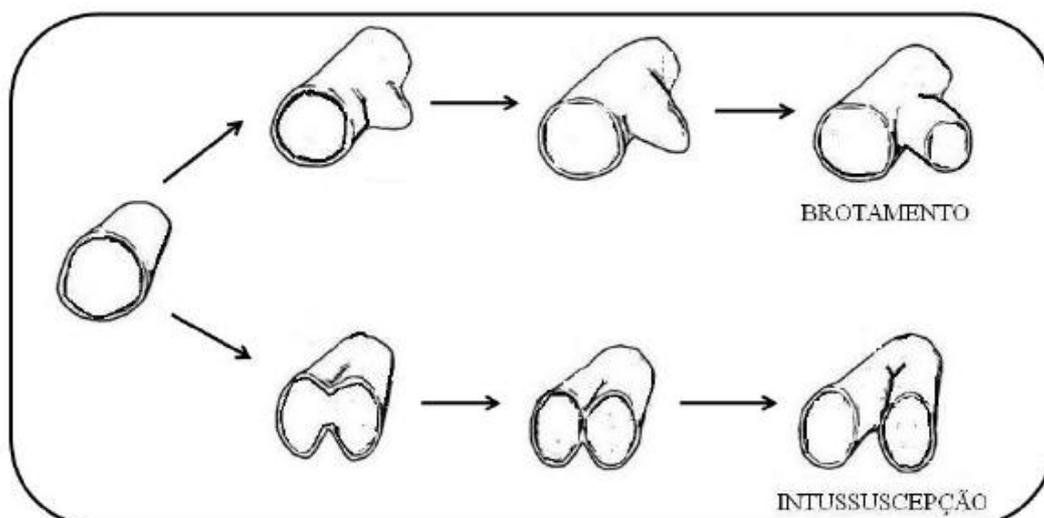


Figura 2. Esquema ilustrativo demonstrando os processos angiogênicos de brotamento e de intussuscepção. Oliveira, 2010.

A ocorrência de desequilíbrio no processo angiogênico promove a formação de vasos sanguíneos desestruturados e com sua capacidade funcional alterada (HASINA e LINGEN, 2001). Essa angiogênese descontrolada, classificada como patológica, é um fator importante na ocorrência de patologias como artrite reumatóide, metástase em tumores, obesidade, aterosclerose (HOEBEN et al., 2004).

Em contra partida, a antiangiogênese é o processo onde há inibição na formação de neovascularização, impedindo assim a proliferação vascular (GONZALES et al., 2003). Representa importante processo para o equilíbrio das funções teciduais, uma vez que a retração na neovascularização reduz as taxas de oxigenação do tecido, que poderiam ocasionar a formação de radicais livres, nocivos ao tecido (SEMEZA, 2002).

1.3.2 ENSAIO ANGIOGÊNICO EM MEMBRANAS CORIOALANTÓIDE DE OVOS EMBRIONADOS DE *Gallus gallus domesticus*

Ensaio avaliativos da capacidade de determinadas substâncias em promover ou suprimir a ação angiogênica são conduzidos em testes *in vivo* ou *in vitro* (VEERAMANI e VENI, 2009). Um importante ensaio *in vivo* é o realizado com a membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha (*Gallus gallus domesticus*), ensaio utilizado em grande escala devido seu baixo custo e facilidade na execução, e que apresenta grande aceitação científica sendo crescente o número de trabalhos utilizando essa técnica para se avaliar substâncias diversas, desde esteróides até anticancerígenos (KATRANCIOGLU et al., 2012).

A utilização da membrana corioalantóide, derivada da fusão entre a mesoderme e a ectoderme coriônica, até o quarto dia do desenvolvimento do embrião (HAMILTON et al., 2002), é devido às taxas de angiogênese na membrana serem crescentes nos 10 primeiros dias, permitindo o sistema vascular atingir sua conformação final até o décimo oitavo dia, considerado o período normal de incubação de 21 dias (MISSIRLIS et al., 1990).

1.4 BIOMATERIAIS E PLANTAS MEDICINAIS

Atualmente no Brasil, a maioria dos biomateriais disponíveis no mercado ainda é importada o que encarece os procedimentos e a utilização destes materiais pela população. Assim, a identificação de novos fármacos em plantas pode gerar o desenvolvimento de novos biomateriais de origem nacional e com menor custo. Nesse sentido, o uso de certas plantas na medicina popular pode ser um bom indicativo da potencialidade de novos medicamentos (NEGRELLE et al., 2007).

Milhares de espécies vegetais possuem valor terapêutico e são frequentemente empregadas na medicina tradicional. Contudo poucas espécies (15% a 17%) têm sido cientificamente estudadas para avaliação de suas qualidades, segurança e eficiência (SOARES et al., 2006).

Um produto vegetal comumente empregado para o tratamento de inúmeras enfermidades é o látex de algumas plantas. Estimativas indicam que existem de 12 a 35 mil espécies lactíferas com seu potencial farmacológico praticamente desconhecido (KONNO et al., 2004). Dentre elas está o látex de *Jatropha curcas* ou pinhão manso, como é popularmente conhecido no Brasil (CEASAR e IGNACIMUTHU, 2011), o qual vem sendo usado por anos na medicina popular em diferentes procedimentos que utilizam de partes vegetais como tratamento para reumatismo, hidropsias, neoplasias e úlceras, além de serem empregadas com diurético e anti-hipertensivo (AQUINO et al., 2006).

Estudos têm demonstrado o potencial medicinal em diversas partes vegetativas de *J. curcas*, sendo evidenciada ação antibacteriana em ensaios realizados com folhas e sementes (IGBINOSA et al., 2009; OSKOUFIAN et al., 2011); ação anti-coagulante a partir do látex (OSONLYI e ANAJOB, 2003); ação anti-inflamatória, determinada em extrato metanólico de raízes de pinhão manso (NAYAK e PATEL, 2010). Já a ação anticancerígena, antimetástica e antiangiogênica, foram demonstradas a partir de compostos presentes na casca, folha, sementes e látex de pinhão manso (THOMAS et al., 2008; BALAJI et al., 2009; RIBEIRO et al., 2012).

Mesmo diante desta variedade de aplicações farmacológicas, o crescimento da área plantada com *J. curcas*, em todo mundo, é devido principalmente ao interesse pela utilização das sementes como fonte de óleo vegetal para produção de biodiesel (ABDRABBO et al., 2009; ABHILASH et al. 2011).

A exploração da cultura no Brasil está em crescimento, estima-se que a produção destinada para obtenção de óleo atinja mais de 16 mil hectares (DUARTE, 2009). Devido essa possível expansão, muitos estudos têm sido realizados na finalidade de se conhecer melhor propriedades que permitam aproveitar ao máximo o potencial desse novo cultivar. Assim, o desenvolvimento de produtos farmacológicos a partir do látex agregaria valor comercial a esse cultivar.

1.5 PINHÃO MANSO

1.5.1 CENTRO DE ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO

O pinhão manso apresenta ampla distribuição na América Latina, e está presente em áreas tropicais no continente africano e asiático (BRITTAINE e LUTALADIO, 2010). Seu correto centro de origem durante muito tempo não foi consenso no meio científico, sendo que alguns autores acreditavam que o Brasil seria o centro de origem da espécie, uma vez que os comerciantes portugueses disseminaram as sementes colhidas no Brasil na África e Ásia (ARRUDA et al., 2004).

Atualmente o meio científico considera a América Central, mais precisamente o México, como país de origem (SUJATHA et al., 2008). Esses autores sugerem que a distribuição de *J. curcas* ocorreu por influência dos índios, os quais migraram do norte para o sul das Américas a cerca de 10.000 anos. Essa hipótese é corroborada pelos estudos de Ricci et al. (2012), que mostraram um alto grau de similaridade genética entre amostras populacionais de *J. curcas* de diferentes regiões fitogeográficas dos continentes americano, africano e asiático.

Algumas características do pinhão manso tais como: rápido crescimento; fácil propagação; adaptação às áreas de alta ou baixa precipitação e alto teor de óleo das sementes são fatores determinantes para a ocorrência da espécie *J. curcas* de forma praticamente espontânea em quase todas as regiões intertropicais (SUJATHA et al., 2008).

A cultura do pinhão manso ainda é considerada em domesticação, sendo que ações como a coleta e formação de banco de germoplasma têm sido desenvolvidas em diversos países, entre eles o Brasil, no sentido de reunir informações que permitam o melhoramento genético da espécie visando maior produtividade e homogeneidade na maturação dos frutos, além de resistência a pragas e doenças (LAVIOLA, 2009).

Estudos realizados com uso de marcadores moleculares em banco de germoplasma na China, Índia e Brasil apresentaram baixa variabilidade nas coleções (ROSADO et al., 2009; PAMIDIMARRI et al., 2010). Segundo Laviola (2009) ainda não existem cultivares melhoradas sendo utilizadas no Brasil, e que os genótipos utilizados nas áreas de cultivo são geneticamente desconhecidos.

1.5.2 DESCRIÇÃO BOTÂNICA

O nome do gênero *Jatropha* é derivado dos termos gregos *iatros* (doutor) e *trophe* (comida), relacionando diretamente suas características com propriedades medicinais, sendo composto de aproximadamente 160 espécies herbáceas e arbustivas com distribuição praticamente cosmopolita em áreas de clima tropical e subtropical (KRISHNAN e PARAMATHMA, 2009).

A *J. curcas* é uma espécie da família Euphorbiaceae, popularmente conhecido no Brasil como pinhão manso (CEASAR e IGNACIMUTHU, 2011). Essa espécie possui genoma relativamente pequeno, com aproximadamente 416 mega bases, sendo o material genético distribuído em 22 cromossomos (CARVALHO et al., 2008).

Em termos taxonômicos, *J. curcas* está classificada da seguinte forma: divisão Magnoliophita, classe Magnoliopsida, subclasse Dilleneadae, superordem Euphorbiana, ordem Euphorbiales, família Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae, tribo Hippomaneae, subtribo Jatrophaeae, gênero *Jatropha*, seção *Curcas*, espécie *Jatropha curcas* Linnaeus (FLORA BRASILIENSIS, 2005; THE TAXONOMICON, 2008). A figura 3 apresenta uma ilustração da espécie.

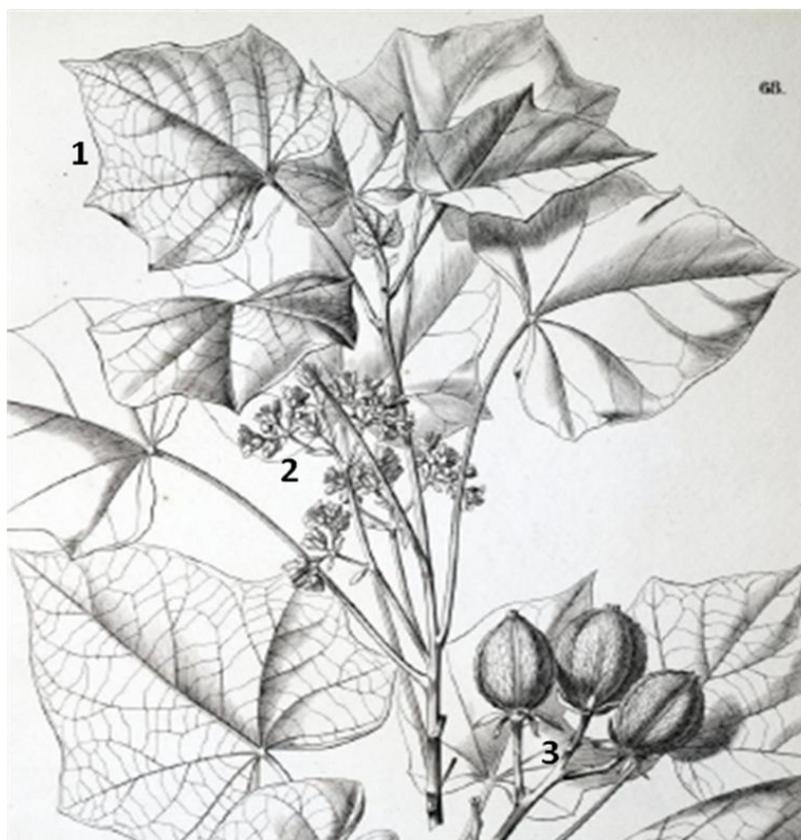


Figura 3. Imagem com desenho representando táxon de *J. curcas*, apresentando: (1) folhas, (2) inflorescência e (3) frutos (FLORA BRASILIENSIS, 2005).

Morfologicamente, segundo Matos et al. (2012), o pinhão manso se apresenta como uma árvore de crescimento acelerado, com aproximadamente 2 a 3 m, podendo alcançar até cinco metros de altura possuindo sistema radicular pivotante com raízes curtas e pouco ramificadas. O caule é liso, suculento, apresentando lenho pouco resistente e medula desenvolvida. O floema tem longos canais que se iniciam desde as raízes, e por onde circula látex, que é bastante cáustico (ARRUDA et al., 2004).

As folhas pecioladas são verdes, largas e brilhantes, palmadas apresentando de 3 a 5 lóbulos. A floração é monóica com pequenas flores unissexuais, sempre com as masculinas ocupando as extremidades superiores dos ramos e as femininas as ramificações (SATURNINO et al., 2005). O fruto é uma cápsula contendo três sementes amendoadas. Esse fruto passa por diferentes estágios de maturação, sendo que, inicialmente o fruto é verde passando para amarelo, castanho e terminando seu amadurecimento na cor preta (MARTINS et al., 2008). As sementes são grandes, podendo a amêndoa representar até 66% do peso da semente, e nesta amêndoa, o endosperma é oleaginoso (SIRISOMBOON et al., 2007).

Em relação à capacidade de tolerância seca, Matos et al. (2012) observaram o fechamento estomático da planta totalmente durante o dia e sua abertura no período noturno,

podendo reduzir assim, em situação de déficit hídrico, a taxa de fotossíntese e a condutância estomática, caracterizando para estes autores um sistema fotossintético misto, variando de acordo com a disponibilidade de água.

Espécies do gênero *Jatropha* apresentam toxicidade nutricional para monogástricos e ruminantes (CARRERA et al., 2012) e alta capacidade irritante sendo que de várias espécies, entre elas a *J. curcas* foram extraídos, isolados e caracterizados ésteres diterpenos, sendo estas substâncias lipossolúveis altamente tóxica e indutora da formação de tumores e resposta inflamatória (GONÇALVES et al., 2009).

Estudo realizado por Liberalino (1988) com ratos tratados com amostras de sementes cruas, cozidas ou assadas revelou alto índice de mortalidade em um período de dois a dezesseis dias. Já o extrato metanólico das frutas apresentou efeito abortivo em ratas grávidas (GOONASEKERA et al, 1995). Entretanto existe a ocorrência de uma variedade de *J. curcas* considerada não tóxica nutricionalmente no México, sendo que Makkar et. al (1998) comparando variedades tóxicas com não tóxicas concluíram que a diferença na concentração de ésteres diternos ou de forbol seria o fator responsável pelos efeitos antinutricionais apresentados pela planta para animais.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo deste trabalho fo avaliar o potencial angiogênico e a toxicidade do látex de *J. curcas*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos dessa proposta são:

- Identificar a toxicidade do látex pelo crescimento das raízes de cebola;
- Avaliar o potencial citotóxico do látex de *J. curcas* pela análise do índice mitótico em células meristemáticas da raiz da cebola;
- Avaliar o potencial genotóxico do látex através da análise da ocorrência de aberrações cromossômicas e frequência de micronúcleos nas células da raiz de cebola;
- Identificar o potencial angiogênico, avaliando a morfologia das membranas corioalantóides (CAM) de ovos fecundados de galinha *Gallus gallus domesticus*, submetidos ao tratamento com látex;

- Verificar a formação de novos vasos sanguíneos, presença de inflamação e hiperemia a partir da análise histológica das membranas CAM submetidas ao tratamento com o látex de *J. curcas*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO LÁTEX DE *J. curcas*

A coleta do látex foi realizada em área de plantio de pinhão manso localizada na estação experimental da Universidade Estadual de Goiás (UEG), campus Ipameri, localizada na rodovia GO 330, km 241. Por se tratar de material nativo, proveniente da região do município de Jataí, sudoeste do estado de Goiás, um exemplar da planta foi identificado pelo Prof. Ms. Ismael Martins Pereira, tendo sua exsicata depositada, com número 10.042, no herbário da UEG. O látex foi extraído diretamente por meio de incisões realizadas no caule com uma faca, a uma altura de um metro e meio do solo, tendo a área de coleta aproximadamente cinco cm de comprimento e 0,5 mm de profundidade. O látex exultado com o corte foi acondicionado diretamente em tubos Falcon de 10 ml esterilizados.

3.2 TESTES COM *A. cepa*

- *Obtenção da Cebola*

Para a execução do teste com *A. cepa* foram adquiridas cebolas no comércio local do município de Ipameri-GO, de tamanho similar e que apresentavam catáfilos externos brancos, não germinados e saudáveis.

- *Grupos Experimentais*

O ensaio com *A. cepa* foi composto por cinco grupos experimentais, onde as soluções foram diluídas em água destilada, sendo esses: 1. solução de látex a 0,1%; 2. solução de látex a 0,5%; 3. solução de látex a 1%; 4. água destilada (controle negativo); e 5. solução de azida sódica na concentração de 2g/L (controle positivo).

- *Procedimentos*

Para cada grupo testado foram separados aleatoriamente 10 bulbos. Em seguida, o parênquima central da coroa de brotamento foi retirado para aumentar a absorção das soluções. Os bulbos foram colocados em recipientes de vidro, com capacidade de 50 mL, deixando a área radicular diretamente em contato com o líquido a ser testado. As raízes foram

inicialmente colocadas em água destilada por três dias, para permitir seu crescimento normal. Após esse crescimento inicial foram mantidas apenas cinco raízes de cada bulbo, todas com aproximadamente dois cm de comprimento, as mesmas foram expostas, por mais 72h aos tratamentos com diferentes concentrações de látex de pinhão manso, além dos controles positivo e negativo. As soluções teste dos tratamentos foram diariamente renovadas. Finalizado o período de 72h, as cinco raízes foram medidas, removidas, fixadas e conservadas em solução de Carnoy (Solução 3:1 de etanol absoluto e ácido glacial acético). A seguir, as pontas foram coletadas para análise citogenéticas e os dados relativos ao crescimento foram anotados para análise estatística para avaliação de toxicidade.

3.2.1 Teste De Toxicidade

Para se inferir sobre o potencial tóxico do látex de pinhão manso, foi realizado teste com *A. cepa* observando e comparando a média de crescimento das raízes em três diferentes concentrações – 0,1%, 0,5% e 1%, com o controle negativo (água destilada). Conforme apresentado no procedimento de sensibilização das raízes para o teste com *A. cepa*, após o período de 72h de sensibilização o comprimento radicular foi medido com régua milimetrada e os valores de crescimento comparados obtendo uma média para cada bulbo avaliado. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), sendo as diferentes médias comparadas pelo teste de Tukey, onde foram consideradas significativas as diferenças maiores que 5% entre os tratamentos ($P \leq 0,05$). As análises foram realizadas no programa computacional STATISCA 5.0.

3.2.2 Teste De Citotoxicidade

O potencial citotóxico do látex de pinhão manso foi avaliado através do ensaio sobre células meristemáticas presentes na coifa da raiz de *Allium cepa* (cebola).

3.2.2.1 Preparo e Análises das Lâminas

Para o preparo das lâminas, foram utilizadas de duas a três raízes, permanecendo as raízes restantes conservadas em Carnoy. As coifas das raízes foram retiradas, lavadas com água destilada e hidrolisadas com HCl (5M) por um minuto, sendo lavadas posteriormente, a seguir fez-se o esfregão e sobre as mesmas e foi colocada a lamínula. As lâminas com as lamínulas foram mergulhadas no nitrogênio líquido e a lamínula retirada. A seguir, o material foi corado com Giemsa a 5%. Utilizando microscópio ótico com recurso de captura de imagens, nos aumentos 40x e 100x, foram avaliados seguintes parâmetros: o número de

células em processo de divisão celular por bulbo, índice mitótico (IM). O índice mitótico por bulbo, para cada tratamento avaliado foi contabilizado e os dados, utilizados para análise estatística.

3.2.2.2 Análise Estatística

Para a realização da análise estatística foram contadas cerca de 1000 células para cada bulbo, totalizando um mínimo de 5000 células em cada tratamento. Os dados quantitativos coletados em cada tratamento foram inicialmente analisados por meio de análise de variância (ANOVA) para se determinar diferenças significativas ($p \leq 0,05$), sendo que posteriormente tiveram suas médias determinadas e comparadas pelo Teste de Tukey, utilizando o programa SISVAR 5.3 (FERREIRA, 2011).

3.2.3 Teste de Genotoxicidade

O látex de pinhão manso foi submetido ao teste de genotoxicidade *in vivo*, por meio do teste com *Allium cepa*, onde o preparo das lâminas foi realizado com o mesmo procedimento descrito para o teste de avaliação de citotoxicidade, sendo que neste teste foi avaliado a presença de anomalias de ciclo mitótico (ACM) e o surgimento de micronúcleos (M). As alterações observadas foram contabilizadas e os resultados comparados estatisticamente.

3.3 TESTE PARA AVALIAR POTENCIAL ANGIOGÊNICO

O potencial angiogênico do látex de *J. curcas* foi avaliado através de ensaio CAM em ovos de galinha fertilizados.

3.3.1 Obtenção dos Ovos Fertilizados

Foram utilizados 120 ovos de galinha fertilizados provenientes do comércio local. O ensaio CAM foi dividido em seis grupos experimentais sendo que cada grupo foi composto de 20 ovos fertilizados. Os seis grupos foram organizados da seguinte forma: 1- controle negativo (água destilada); 2- controle inibitório (solução de dexametasona 4mg/ml – nome comercial Decadron[®], produzida pela Aché Laboratórios Farmacêuticos, lote nº 1204279); 3- controle positivo (Regederm[®] - pomada cicatrizante produzida pela Pele Nova Biotecnologia); 4- solução de água destilada com látex de pinhão manso diluído a 25%; 5- solução de água destilada com látex de pinhão manso diluído a 50%; 6- látex de pinhão manso puro.

3.3.2 Procedimento Experimental

Os ovos fertilizados foram incubados a temperatura, 37° C e umidade, 60 a 70%, mantida constante por um período de cinco dias. No quinto dia os ovos tiveram a extremidade de sua casca retirada possibilitando acesso à membrana CAM, sendo que neste momento o orifício foi lacrado por meio de um filme, mantendo a esterilidade da membrana. Os ovos retornaram à estufa até o décimo terceiro dia, momento em que as substâncias (água destilada, látex de pinhão manso, Regederm[®] e dexametasona) foram colocadas em contato com as CAM, através de discos de papel absorvente, com sete mm de diâmetro, contendo aproximadamente de três a cinco microlitros de solução. Os grupos de ovos foram avaliados tendo decorrido o período de 72 horas após o contato com a respectiva substância em análise. Neste momento as membranas CAM foram cortadas com tesouras cegas curvas, fixadas e conservadas em solução de formaldeído a 3,7%.

3.3.3 Obtenção e Análise Estatística das Imagens

Através de uma câmera digital Canon PowerShot SD850 IS 8.0 megapixels foram tiradas fotos das membranas CAM. A análise e quantificação da rede vascular neoformada foram feitas por meio das imagens. A área percentual de cada ensaio foi determinada utilizando os programas, Gimp 2.8 e Imagem J 1.47v. A análise estatística foi realizada através da comparação das médias quantificadas pela análise de variância (ANOVA), e as médias de vascularização comparadas pelo teste de Tukey, considerando diferenças significativas as que apresentarem $p \leq 0,05\%$, programa SISVAR.

3.3.4 Análises Histológicas

As membranas CAM dos ovos fertilizados submetidos aos diferentes tratamentos foram fixadas com formaldeído 3,7% e embebidas em parafina. A seguir, os blocos de parafina foram cortados com micrótomo e os fragmentos corados com solução de hematoxilina e eosina. O tecido das membranas corioalantóides foi avaliado microscopicamente e tiveram contabilizados os seguintes parâmetros: 1. ocorrência de novos vasos sanguíneos; 2. presença de elementos inflamatórios e 3. ocorrência de hiperemia. Os diferentes parâmetros foram analisados e os resultados visualmente classificados de acordo com a intensidade em: ausente (0); discreto (1); moderado (2) e acentuado (3). A análise estatística do ensaio histológico foi realizada através de teste não-paramétrico, chamado Kruskal Wallis. Foram consideradas significativas as diferenças maiores que 5% entre os tratamentos ($P \leq 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ENSAIO COM *Allium cepa*

4.1.1 Toxicidade

Segundo Costa et al. (2008) toxicidade é a capacidade de uma determinada substância em causar efeito danoso a um organismo. Segundo Adam e El-Shhry (2010) o crescimento radicular está diretamente associado ao número de células em processo de divisão celular no meristema das raízes. Nos testes de toxicidade, amostras com diferentes concentrações são avaliadas e as alterações em relação aos padrões de normalidade, como alteração no crescimento da raiz, mudança de cor, formato ou textura, por exemplo, são observadas e quantificadas comparativamente a um controle negativo (RONCO et al., 2004).

Para se determinar o percentual inicial das concentrações de látex, foram inicialmente testadas, os percentuais 1%, 5% e 10%. Os resultados obtidos mostraram que nas concentrações de 5 e 10% o crescimento da raiz foi inibido e houve um embranquecimento da coifa após as 72h de sensibilização, isso inviabilizou, a realização de experimentos nessas concentrações (Figura 4).

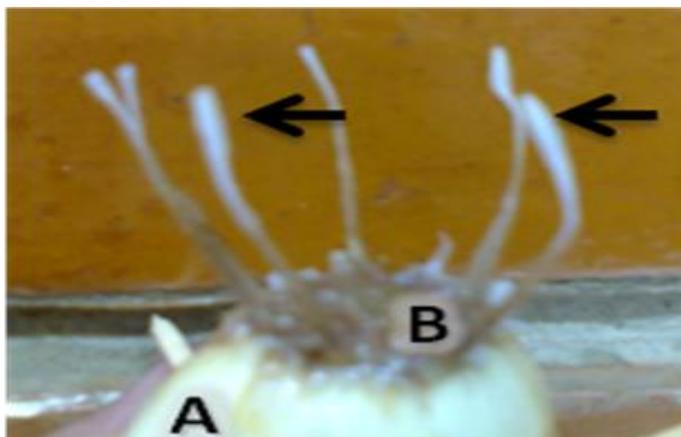


Figura 4. Foto digital destacando o bulbo (A), o caule (B) e, com setas destacando as pontas das raízes de *Allium cepa* alteradas, para tratamento com látex de pinhão manso a 5%.

Diante disso, optou-se por realizar o teste de *A. cepa* em soluções mais diluídas. Os ensaios foram realizados com soluções de látex na concentração de 0,1%, 0,5% e 1%. A Tabela 1 apresenta os resultados do crescimento da raiz nas diferentes concentrações testadas.

Tabela 1. Taxa e média de crescimento da raiz de *A. cepa*, por bulbo, com desvio padrão, para controle negativo e tratamentos em diferentes concentrações de látex de *J. curcas*.

Tratamentos	Taxa de Crescimento das Raízes em centímetros	Médias de Crescimento ± DP	Teste de Tukey
Água	2,8; 2,9; 2,8; 3,0; 2,7	2,8 ±0,12	A
Látex 0,1%	0,7; 0,8; 0,8; 0,6; 0,7	1,0 ±0,06	B
Látex 0,5%	0,1; 0,1; 0,2; 0,1; 0,1	0,2 ±0,08	C
Látex 1%	0,0; 0,1; 0,0; 0,1; 0,1	0,0 ±0,05	C

Letras iguais representam tratamentos onde não houve diferença significativa ($P \leq 0,05$), teste de Tukey.

O resultado apresentado na Tabela 1 sugere que o látex de pinhão manso apresenta capacidade tóxica, interferindo no crescimento das raízes de cebola. Estatisticamente ao se comparar as médias de crescimento das raízes dos tratamentos com látex ao controle negativo, estes apresentaram resultados inferiores, sendo que os tratamentos com 0,5% e 1% não difeririam estatisticamente entre si, sendo classificados com a letra C, apresentando comparativamente com os demais tratamentos, pelo pós-teste de Tukey, menor média de crescimento.

Nos tratamentos com látex de pinhão manso, até a menor concentração, 0,1%, apresentou diferença significativa (média inferior em mais de 50%) quando comparada à água destilada, sendo que este tratamento foi classificado com a letra B, enquanto que o controle negativo (água destilada), representado pela letra A, apresentou a maior média de crescimento. Esse resultado evidencia que na presença do látex o crescimento radicular foi alterado, denotando condição de toxicidade.

Esse resultado reforça o perfil de toxicidade da *J. curcas*, sendo que há diversos estudos científicos, com o óleo extraído das semente de pinhão manso, relacionando essa capacidade tóxica à presença de várias substâncias, principalmente as substâncias curcina e aos ésteres de forbol (MENDONÇA e LAVIOLA, 2009). Gandhi et al. (1995) apresentaram estudo sobre o óleo de pinhão manso, em que a dose letal para metade dos ratos avaliados (DL50) foi observada com a administração de apenas 6 mL/Kg do animal.

4.1.2 Citotoxicidade

Uma forma de se determinar o potencial citotóxico de uma substância é avaliar as alterações que essa substância causa no padrão funcionamento e ocorrência de divisão celular.

No teste com *A. cepa* essas alterações podem ser avaliadas comparando a taxa dos índices mitóticos (IM).

O índice mitótico é determinado pela porcentagem de células em fase mitótica. A redução nesse percentual de células pode ser interpretado tanto como morte celular como possível atraso no movimento de proliferação celular (PANDA et al., 2005) Para Leme e Marin-Morales (2009) o IM é um importante parâmetro na avaliação da citotoxicidade de uma substância, e alterações que levem a redução do IM, em relação a um controle negativo, pode expressar a ação de substâncias químicas interferindo tanto no crescimento quanto no desenvolvimento do organismo sensibilizado. Quando a alteração no IM for maior do que o apresentado pelo controle negativo, este também pode ser considerado prejudicial uma vez que pode acarretar a formação de tumores, devido à proliferação anormal das células.

De acordo com essa premissa os resultados obtidos, apresentados na Tabela 2, permitem inferir sobre a citotoxicidade do látex de pinhão manso uma vez se compara os tratamentos nas diferentes concentrações (0,1; 0,5 e 1%), com controle negativo (água destilada) e controle positivo (azida sódica).

Tabela 2. Análise de lâminas, teste com *Allium cepa*, para a avaliação de citotoxicidade e genotoxicidade do látex de pinhão manso.

Tratamentos	Total de células	Total de células em divisão	Citotoxicidade	Genotoxicidade	
			Índice Mitótico (%)	Número de Anomalias	Número de Micronúcleos
Látex 1%	6.749	70	1,0 B	3 B	0 B
Látex 0,5%	5.237	84	1,6 B	23 B	0 B
Látex 0,1%	5.641	404	7,1 B	253 A	2 B
Água	5.060	1.325	26 A	0 B	1 B
Ázida sódica	6079	514	8,4 B	254 A	98 A

Letras iguais representam tratamentos onde não houve diferença significativa ($P \leq 0,05$), teste de Tukey.

Os valores apresentados na Tabela 2 evidenciam a diminuição acentuada do IM nos tratamentos com látex de pinhão manso, quando comparada com o controle negativo. O valor do índice mitótico apresentado pelo látex é inferior inclusive ao controle positivo (azida sódica), substância reconhecidamente citotóxica. A análise estatística com a discriminação

das médias pelo Teste de Tukey confirma essa observação uma vez que as médias apresentadas pelos tratamentos com látex de pinhão manso foram semelhantes ao controle positivo, apresentando IM inferior a 50% ao controle negativo (água destilada), caracterizando ação de citotoxicidade.

Segundo Ezaki et al. (2008) a presença de substâncias nocivas alteram o metabolismo celular e desencadeiam efeitos tóxicos ao interagir com metabólitos e estruturas celulares, ocasionando distúrbios no ciclo e divisão celular e conseqüentemente ocasionando a alteração no padrão de normalidade no crescimento tecidual.

Desta forma, resultado semelhante em relação à citotoxicidade foi apresentado na avaliação do óleo extraído das sementes de pinhão manso, em três concentrações (22,5%; 45%; 67,5%), em bioensaio com alface (*Lactuca sativa*), sendo que a redução no IM neste estudo foi significativa em todos os três tratamentos quando comparados com o controle negativo (água destilada), com $p \leq 0,05$, pelo teste de Kruskal-Wallis (BOTELHO et al., 2011).

Ribeiro et al. (2012) apresentaram estudo com diversas plantas utilizadas de forma medicinal no Brasil, dentre elas o pinhão manso, sendo que a avaliação citotóxica do extrato metanólico de folhas de pinhão manso foi utilizada *in vitro* para sensibilizar linhagens de células tumorais humanas, resultando na inibição entre 55 a 88% no crescimento destas. Esse resultado evidencia a capacidade citotóxica presente na espécie *J. curcas*.

4.1.3 Genotoxicidade

A ocorrência de aberrações cromossômicas na divisão celular e a ocorrência de micronúcleos nas células avaliadas evidenciam o potencial genotóxico de uma substância (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Segundo Campos et al. (2008), a ocorrência de micronúcleo decorre da perda de pedaços ou mesmo de cromossomos inteiros, devido ação de agentes que danificam o material genético ou modificam o ciclo mitótico. Estes fragmentos de cromossomos permanecem livres no citoplasma, formando membrana própria e segundo esse mesmo autor, por ser semelhante ao núcleo em constituição e propriedade de coloração, pode ser facilmente reconhecido, constituindo uma técnica simples de estimar dano genético induzido.

O resultado apresentado na Tabela 2 mostrou que o látex de pinhão manso nas concentrações de 1% e 0,5% apresentou baixo número de aberrações cromossômicas. Porém na concentração de 0,1% o número de aberrações cromossômicas foi muito elevado, a taxa foi superior ao controle positivo (azida sódica).

A relação entre o fato da solução mais diluída do látex apresentar maior genotoxicidade que as soluções mais concentradas podem ser explicadas quando analisamos os dados de citotoxicidade e genotoxicidade conjuntamente. Os dados obtidos mostram que em altas concentrações o látex causa o atraso na proliferação e/ou morte celular e dessa forma não existem células em divisão, não sendo possível observar anomalias cromossômicas. Já em menores concentrações, o efeito citotóxico não é observado e as células entram em divisão. Contudo, essa divisão é alterada, com a presença de muitas anomalias cromossômicas, classificando essa substância como genotóxica.

Resultados semelhantes foram obtidos por Andrade-Vieira et al. (2014) avaliando o óleo de *J. curcas* em bioensaio com *Lactuca sativa*, onde a presença de substâncias no óleo ocasionaram modificações no ciclo celular e induzindo alterações cromossômicas e nucleares. Neste mesmo estudo os autores destacam que esta toxicidade pode ser atribuída a presença de ésteres de forbol, fitoquímico tóxico comum plantas do gênero *Jatropha*, e que segundo Devappa et al. (2010) a concentração dessa substância no óleo pode chegar a 75%.

Entre os diferentes tipos de anomalias observadas as mais comuns foram atrasos no fuso mitótico, as pontes anafásicas e os cromossomos pegajosos (Figura 5).

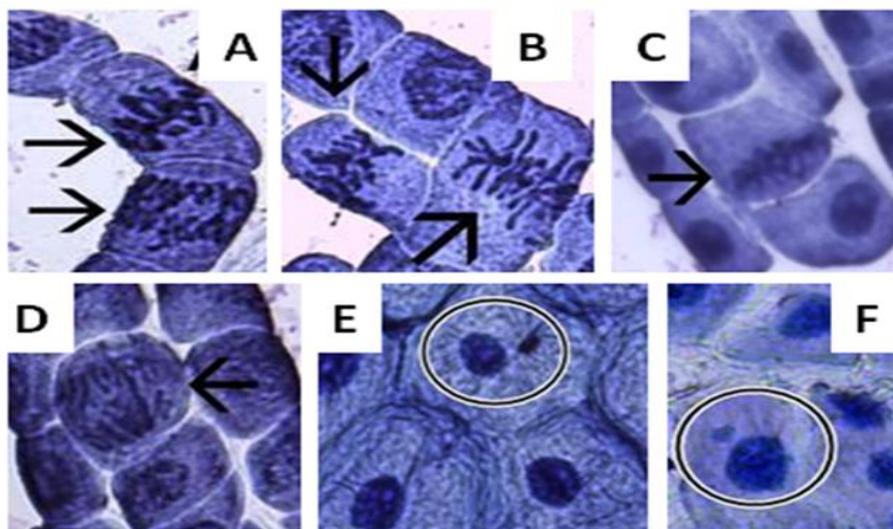


Figura 5. Fotografias de células das raízes de cebola em diferentes concentrações de látex de pinhão manso com aumento de 100x. **A:** células na concentração de 0,1% com ocorrência de cromossomos condensados e atraso no fuso mitótico; **B:** células na concentração de 0,1% com ocorrência de anomalia de cromossomos perdidos; **C:** células na concentração de 0,5% com ocorrência de cromossomos pegajosos; **D:** células na concentração de 0,5% com ocorrência de pontes anafásicas; **E e F:** células na concentração de 0,1% evidenciando micronúcleos.

Em relação à incidência de micronúcleos, estes não foram observados nas diferentes concentrações do látex de pinhão manso testadas. Contudo, o tratamento com azida sódica evidenciou uma alta frequência de micronúcleos. As análises estatísticas da genotoxicidade confirmam esses resultados e mostram que não existem diferenças significativas entre os tratamentos a 1% e 0,5% em relação ao controle negativo. Por outro lado, obteve-se uma diferença altamente significativa quando comparado os tratamentos a base de látex 0,01% com o controle negativo.

Esses resultados evidenciam estatisticamente que o látex de pinhão manso é genotóxico na concentração de 0,01% sendo o número de anomalias superior ao controle positivo, evidenciando o risco da utilização indiscriminada por parte da população de partes de plantas no tratamento de enfermidades, ignorando a toxicidade presente nestes compostos (ALBERTASSI et al., 2010).

4.2 ENSAIO COM A MEMBRANA CORIOALANTÓIDE

4.2.1 Avaliação de Vascularização das CAM por Tratamento de Imagem

A Figura 6 mostra os resultados das membranas corioalantóides (CAM) de ovos de galinha submetidos aos diferentes tratamentos.

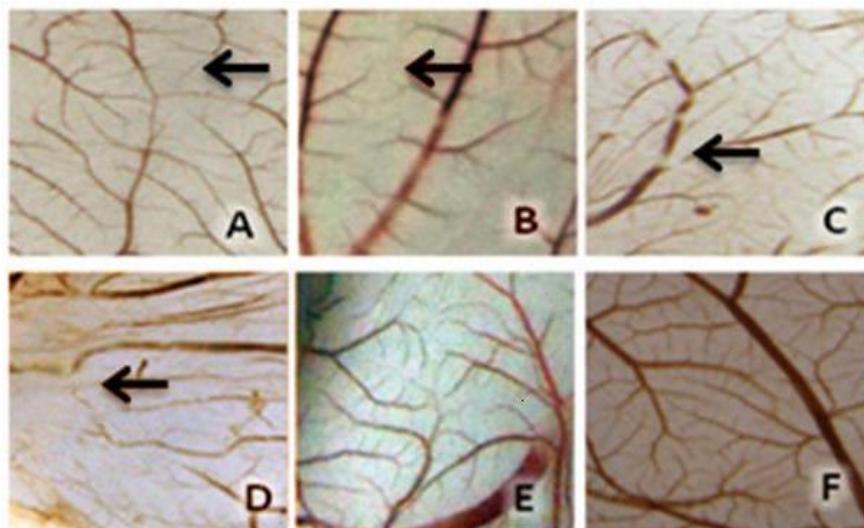


Figura 6. Imagens de membrana corioalantóide de embrião de galinha (CAM) nos tratamentos com látex de pinhão manso nas concentrações: A (25%), B (50%), C (100%), e dos controles: D (Dexametasona, controle inibidor), E (Água, controle negativo) e F (Regederm[®], controle positivo). As setas indicam ocorrência de falhas na vascularização.

A análise visual permite inferir a ocorrência de menor formação de vasos em A, B, C e D, quando comparados às imagens E e F. Permite também observar que nestes quatro tratamentos o padrão de vascularização não é homogêneo e contínuo, podendo ser visualizadas falhas nos vasos, destacadas por setas.

Já em relação aos tratamentos E (água destilada) e F (Regederm[®]) o padrão de vascularização está mais ramificado e com rede de vasos e capilares melhor distribuídos, caracterizando um tecido com melhor distribuição de nutrientes e condições de desenvolvimento.

Para a realização do teste de quantificação de vascularização as membranas CAMs foram digitalizadas e a seguir as imagens foram submetidas ao programa Image J 1.47v, o qual permitiu a quantificação da área vascularizada. Sendo que a média de vascularização dos tratamentos foi comparada estatisticamente e as diferentes médias discriminadas pelo pós-teste de Tukey, com $p \leq 0,05$. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem e média de vascularização de membrana corioalantóide (CAM), com desvio padrão, em relação aos tratamentos com: Látex de *J. curcas* nas concentrações 100%, 50% e 25%, água destilada, dexametasona e Regederm[®].

Tratamentos	Porcentagem de Vascularização	Média de Vascularização \pm SD	Teste de Tukey
Látex (100%)	6,7; 6,5; 7,1; 8,8; 6,9; 7,8; 6,6; 6,2; 7,6; 6,6; 4,9; 7,9; 7,1; 6,2; 5,6; 6,2; 6,7; 6,7; 6,5; 6,3	6,7 \pm 0,8	D
Látex (50%)	5,9; 6,5; 6,2; 5,3; 4,6; 7,5; 7,8; 7,5; 6,8; 6,8; 5,6; 8,0; 8,1; 7,7; 7,4; 8,1; 7,2; 7,1; 8,2; 7,4	7,0 \pm 1,0	D
Látex (25%)	13,7; 12,9; 8,9; 11,4; 8,8; 7,7; 9,2; 7,4; 11,6; 10,1; 11,5; 8,8; 8,4; 11,7; 13,2; 11,6; 10,6; 8,4; 12,7; 8,6	10,4 \pm 1,9	C
Água Destilada (Negativo)	14,4; 11,1; 14,1; 13,1; 15,4; 16,5; 14,0; 12,2; 13,4; 8,0; 11,8; 13,1; 12,1; 11,3; 10,3; 9,8; 11,7; 8,5; 9,0; 10	12,0 \pm 2,3	B
Dexametasona (Inibidor)	5,5; 6,8; 8,2; 3,6; 5,7; 4,3; 4,6; 6,1; 7,4; 7,2; 4,3; 4,4; 4,7; 5,5; 4,1; 5,1; 8,4; 4,7; 7,8; 6,6	5,8 \pm 1,4	D
Regederm [®] (Positivo)	22,9; 21,3; 21,5; 22,8; 23,4; 23,0; 25,8; 23,7; 24,2; 25,7; 24,0; 22,4; 26,3; 23,2; 19,9; 20,6; 19,7; 21,9; 21,6; 19,0	22,6 \pm 2,0	A

Média de vascularização para cada tratamento determinada pelo programa SISVAR, segundo teste de Tukey, ($p \leq 0,05$). Letras iguais representam tratamentos onde não houve diferença significativa.

Os resultados apresentados na Tabela 3 indicam a ação inibitória do látex de pinhão manso sobre a formação de vasos sanguíneos nas concentrações de 100 e 50%, sendo pelo pós-teste classificadas com a letra D - a mesma classificação foi atribuída ao controle inibitório (dexametasona). O tratamento composto pela solução de látex de pinhão manso a 25% foi classificado com a letra C, apresentando média inferior ao controle negativo, classificado com a letra B, mas superior aos demais tratamentos com látex e ao controle inibitório.

O grupo onde foi avaliada a pomada Regederm[®] (controle positivo) apresentou as maiores médias entre todos os demais tratamentos avaliados, com média de 22,6 sendo por isso classificada com a letra A.

As diferenças em relação aos resultados obtidos nos grupos experimentais de 25% em relação aos grupos 50% e 100% mostram que o efeito da concentração do látex pode interferir no potencial angiogênico da substância testada. Essa relação entre a concentração de látex utilizada em uma solução é uma importante característica a ser considerada, devido a presença em lactíferas de substâncias causadoras de efeitos nocivos ao organismo vivo.

Melo-Reis (2010) apresentou em seu trabalho resultado positivo em relação a ação promotora de vascularização do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. em ensaio com CAM nas concentrações de 10 a 20 mg/ml, entretando no mesmo teste com membranas corioalantóide quando foi utilizado o látex puro de *S. umbellatum*, este levou à morte os embriões.

A relação entre a concentração e o potencial angiogênico também foi observado em estudo realizado por Bessa (2010) na avaliação do potencial angiogênico do látex de *Euphorbia turicalli*. No estudo de Bessa (2010), quando a solução aquosa de látex de *E. turicalli*, na concentração de 1 mg/mL, foi avaliada através de ensaio com CAM, esta apresentou atividade angiogênica semelhante ao controle positivo testado (Biocure[®]), evidenciando desta forma a capacidade angiogênica da solução com látex nesta concentração, entretanto o tratamento com o látex puro desta planta acarretou na destruição da membrana e ocasionou a morte do embrião.

Assim, os resultados obtidos nessa pesquisa evidenciam o potencial antiangiogênico presente no látex de *J. curcas* por apresentar resultados semelhantes ao do controle inibitório utilizado (dexametasona), e permite concluir que a concentração do látex de pinhão manso pode ser fator limitante para sua aplicação, uma vez que o látex em menor concentração apresentou melhor resultado quando comparado aos demais tratamentos com látex.

Os resultados apresentados no presente trabalho em relação à utilização do látex de pinhão manso, reforça o estudo apresentado por Figueiredo et al. (2013), que afirmam que mesmo apresentando algum tipo de efeito medicinal a ocorrência de potencial tóxico está presente em diversas espécies comumente utilizadas na medicina popular como por exemplo: o guaco, a babosa, a mamona, dentre outras.

4.2.2 Avaliação do Processo Angiogênico em Ensaio Histológico

Para a avaliação histológica as membranas corioalantóides foram analisadas microscopicamente e a ocorrência de fatores como a hiperemia, a presença de elementos inflamatórios e a formação de novos vasos sanguíneos (neovascularização) foram considerados para a determinação da ação angiogênica.

A ocorrência da hiperemia, caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo numa determinada região, está relacionada diretamente a capilarização ocasionada pelo aumento quantitativo nos vasos sanguíneos funcionais, facilitando conseqüentemente a ocorrência de elementos inflamatórios (MITCHELL, 2005).

Desta forma, hiperemia e inflamação são eventos que estão diretamente associados. Assim o aumento na ocorrência de células inflamatórias é importante uma vez que estas células, ativam fatores que são precursores endoteliais como citocinas e fator de crescimento endotelial vascular, específicos de células de crescimento e no início e amplificação da resposta inflamatória (DONA et al., 2003; ZIJLSTRA et al., 2006; MAY et al. 2008), induzindo o processo de surgimento de novos vasos sanguíneos e o desenvolvimento dos vasos pré-existentes.

A Figura 7 apresenta fotomicrografias representando os diferentes tratamentos avaliados, sendo que as setas destacam a presença de vasos neoformados e de elementos inflamatórios, parâmetros importantes no processo angiogênico. Nesta, as setas cheias destacam a ocorrência de elementos inflamatórios tanto em tratamento com látex, quanto nos controles positivo (Regederme®), negativo (água destilada) e até mesmo no inibitório (dexametasona).

A ocorrência de vasos recém-formados ou neoformados, caracterizados por terem sua estrutura capilar formada por uma ou duas unidades celulares, estão destacadas em setas tracejadas, sendo que neste caso estão evidenciadas no tratamento látex a 50% e no controle positivo (Regederme®).

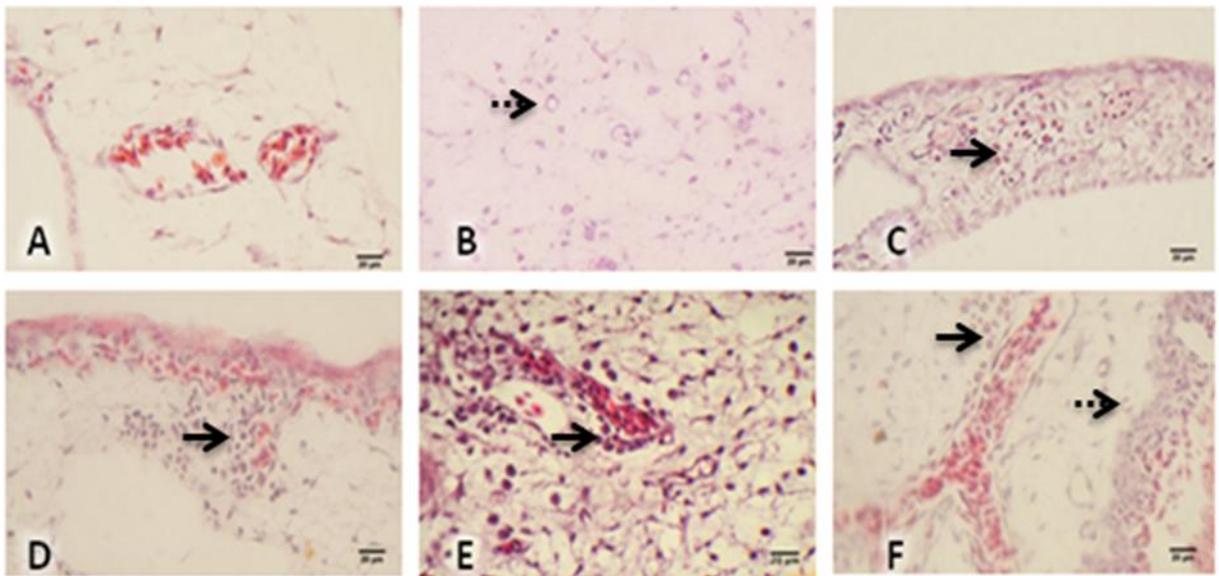


Figura 7. Imagens histológicas dos tratamentos: A-Látex a 25%, B-Látex a 50%, C-Látex Puro, D-Dexametasona (Controle Inibitório), E-Água (Controle Negativo), F-Regederm® (Controle Positivo). Setas cheias indicam a ocorrência de elementos inflamatórios nos diferentes tratamentos, enquanto de as setas tracejadas evidenciam vasos neoformados.

Na análise visual das micrografias a ocorrência dos três fatores avaliados: hiperemia, presença de elementos inflamatórios e a formação de novos vasos sanguíneos, para determinação estatística foram quantificados, sendo para a ocorrência de cada um dos fatores avaliados, foi considerado (0) para ausente; (1) para discreto; (2) para moderado; (3) para acentuado. Os resultados foram então submetidos à análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, com $p \leq 0,05$, sendo posteriormente submetidos ao teste de Bonferroni, para diferenciação entre os grupos/tratamentos.

Nos resultados, expressos em porcentagem, estão apresentados na Tabela 4, onde em relação à ocorrência de elementos inflamatórios os tratamentos diferiram estatisticamente segundo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando $p \leq 0,05$, sendo que no pós-teste de Bonferroni, o controle positivo se diferenciou dos demais tratamentos, na ocorrência de elementos inflamatórios, sendo classificada pelo teste com a letra A. Neste pós-teste, a avaliação da ocorrência deste quesito, os tratamentos com látex nas três concentrações testadas, assim como o controle negativo e inibitório, foram semelhantes e, por isso, classificados com a letra B.

Tabela 4. Dados de análise estatística de CAM nos respectivos tratamentos apresentados em porcentagem. Médias discriminadas segundo o teste T de Bonferroni.

		Dados da Análise Histológica					
tratamentos		Elementos Inflamatórios		Hiperemia		Neovascularização	
		(%)	Média	(%)	Média	(%)	Média
Dexametasona	0	80		80		100	
	1	20	0,2B	20	0,2C	-	0,0B
	2	-		-		-	
	3	-		-		-	
Látex a 25%	0	80		40		40	
	1	20	0,2B	60	0,6BC	60	0,6B
	2	-		-		-	
	3	-		-		-	
Látex a 50%	0	100		40		100	
	1	-	0,0B	40	0,8BC	-	0,0B
	2	-		20		-	
	3	-		-		-	
Látex Puro	0	60		40		100	
	1	40	0,4B	60	0,6BC	-	0,0B
	2	-		-		-	
	3	-		-		-	
Água Destilada	0	60		-		100	
	1	20	0,8B	40	1,6AB	-	0,0B
	2	-		60		-	
	3	20		-		-	
Regederm®	0	-		-		-	
	1	20	2,4A	-	2A	40	2,2A
	2	20		100		-	
	3	60		-		60	
Kruskal-Wallis	p ≤ 0,05	0,008*		0,03*		0,002*	

Para análise estatística, as alterações foram consideradas da seguinte forma: (0) para ausente; (1) para discreto; (2) para moderado; (3) para acentuado. Os dados foram submetidos a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis com $p \leq 0,05$. Médias seguidas de mesma letra não se diferem estatisticamente pelo teste T de Bonferroni. *Resultado estatisticamente significativo.

Em relação à ocorrência de hiperemia o resultado estatístico apresentado evidencia a diferença entre os tratamentos, para $p \leq 0,05$, sendo no pós-teste de Bonferroni, a avaliação dos resultados não nos permite afirmar que houve tratamento melhores, dada a discriminação apresentada por letras, que se sobrepõe. Entretanto numericamente há diferença entre os

resultados do controle positivo e negativo, em relação aos tratamentos com látex de pinhão manso e o controle inibitório.

A diferença entre os tratamentos também foi ainda mais significativa em relação a ocorrência de neovascularização, sendo que novamente pelo teste de Bonferroni, o tratamento com Regederm[®] se diferenciou dos demais, sendo discriminado com a letra A. Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente e foram classificados com a letra B.

Os resultados apresentados seguem que a pomada Regederm[®], comercializada pela empresa PeleNova[®], produto derivado do látex de seringueira, apresenta potencial angiogênico, já em relação aos demais tratamentos os dados expressam a falta de capacidade destes em promover ações que desencadeiem atividade angiogênica sobre a membrana corioalantóide de galinha.

5. CONCLUSÃO

Milhares de espécies vegetais apresentam valor terapêutico, entretanto poucas espécies apresentam estudos científicos avaliando suas qualidades, eficiência e segurança. A utilização na medicina popular pode ser um bom indicativo da potencialidade de uma espécie para o desenvolvimento de novos medicamentos. O presente trabalho analisou duas importantes características, a biofuncionalidade e a biocompatibilidade, do látex *Jatropha curcas*, uma planta lactífera com ocorrência cosmopolita, que é utilizada na medicina popular de diversas formas para o tratamento de enfermidades variadas. Estudos científicos demonstraram a capacidade farmacológica de partes da planta, sendo que em relação ao látex ainda há poucos trabalhos publicados. Para essa análise foram realizados bioensaios *in vivo* para avaliar o potencial angiogênico e a toxicidade do látex. Os resultados em relação à toxicidade do látex de *J. curcas*, evidenciam o potencial tóxico, citotóxico e genotóxico do mesmo, ainda que em pequenas concentrações. Quanto à avaliação angiogênica, o látex de pinhão manso apresentou ação antiangiogênica semelhante ao controle negativo utilizado. Desta forma o conjunto de dados analisados e os resultados apresentados sugerem que novos ensaios sejam realizados na finalidade de se determinar a potencialidade do látex de pinhão manso para o desenvolvimento de novos biomateriais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDRABBO, A. et al. Response of *Jatropha curcas* L. to water deficits: yield, water use efficiency and oilseed characteristics. **Biomass and Bioenergy**, v.33, p.1343-1350, 2009.

ABHILASH P. et al. Revisited *Jatropha curcas* as an oil plant of multiple benefits: critical research needs and prospects for the future. **Environmental Science and Pollution Research**, v.18, n.1 p.127-131, 2011.

ADAM, F.I.M.; EL-ASHRY, Z.M. Evaluation of genotoxicity of 4-n-nonylphenol using *Vicia faba* L. **Journal of Biological Sciences**, v.10, n.4, p.368-372, 2010.

ANDRADE-VIEIRA et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.86, n.1, p.373-382, 2014.

AQUINO, J.U. et al. Avaliação fitoterápica da *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de suturas na parede abdominal ventral de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.21, p.61-66, 2006.

ARRUDA, F.P. et al.. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.8, p.789-799, 2004.

BAGATINI, M.D. et al. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais, **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, n.3, p. 444-447, 2007.

BALAJI, R. et al. Antimetastatic and antiproliferative activity of methanolic fraction of *Jatropha curcas* against B16F10 melanoma induced lung metastasis in C57BI/6 mice. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v.3, n.11, p.547-555, 2009.

BERGERS, G., BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nature Reviews Cancer**, v.3, n.6, p.401-410, 2003.

BESSA, G.O. Avaliação do potencial angiogênico e do potencial de cicatrização do látex de *Euphorbia tirucalli* (aveloz). *Dissertação de Mestrado*. Pontifícia Universidade Católica de Goiás,GO: PUC Goiás, 2010. 50p.

BOTELHO et al., Avaliação da toxidez do óleo de pinhão manso em Bioensaios vegetais. In CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISA EM PINHÃO-MANSO, 2., 2011, Brasília,DF. Pinhão-manso: focando em soluções sustentáveis para produção de biocombustíveis:anais. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia: ABPPM, 2011. 1 CD-ROM

BRITTAINE, R.; LUTALADIO, N. *Jatropha*: A Smallholder Bioenergy Crop The Potential for Pro Poor Development. Integrated Crop Management, **FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations)**, Roma, v. 8, 2010. 96 p.

CAO, Y,; WANG, B. Biodegradation of silk biomaterials. **International Journal of Molecular Sciences**. v.10, p.1514-1524, 2009.

- CAMPOS et al., Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis in Allelopathic Interactions. In: **Plant Bioassays**. Ed. Houston: Studium Press, 2008. 344 p.
- CARREIRA, R. A. B. et al. Protein co-products and by-products of the biodiesel industry for ruminants feeding. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.4, p.1202-1211. 2012.
- CARVALHO, C.R. et al. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L. an important biofuel plant. **Plant Science**. n.74, p.613–617, 2008.
- CEASAR, S.A.; IGNACIMUTHU, S. Applications of Biotechnology and Biochemical Engineering for the Development of *Jatropha* and Biodiesel: A Review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.15, p.5176 – 5185, 2011.
- CUCHIARA, C.C. et al. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Tecnologia, Ciência e Agropecuária**, João Pessoa, v.6, n.1, p.33-38, 2012.
- COSTA et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008.
- DEVAPPA, R.K. et al., Quality of biodiesel prepared from phorbol ester extracted *Jatropha curcas* oil. **Journal American Oil Chemical Society**, v.87, p.697-704, 2010.
- DIAS, L.A.S. et al. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal Viçosa, MG: UFV, 2007, 40p.
- DUARTE, A. O peso da matéria-prima. **BiodieselBR**, n.9, 2009. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/revista/009/o-peso-da-materia-prima.htm>> Acessado dia 10/08/2013.
- EZAKI, B. et al., Wild plants, *Andropogon virginicus* L. and *Miscanthus sinensis* Andres, are tolerant to multiple stresses including aluminium, heavy metals and oxidative stresses. **Plant Cell Report**, v.27, p.951-961, 2008.
- FERNANDES, T.C.C. et al. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pestic Biochem Physiology**, n.88, p.252–259, 2007.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, n.6, p.1039-1042, 2011.
- FIGUEIREDO et al. Potencial mutagênico de plantas medicinais. In: CONGRESSO NORDESTINO DE BIÓLOGOS, 1, 2013, João Pessoa. *Anais...*João Pessoa: Rebibio, 2013. p.115-119
- FLORA BRASILIENSIS Vol 11 Part 2 pag. 487-488 tab. 68. 2005 Disponível em: <<http://florabrasiliensis.cria.org.br/taxonCard?id=FB9775>> acessado 08/11/2014.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? **Nature**, n.6, p.273-286, 2007.

- FREITAS et al. Sistema VEGF, um alvo multi-terapêutico. **Revista Virtual Química**, v.1, n.3, p.257-269, 2009.
- GANDHI, V.M. et al. Toxicological studies on ratanjyot oil. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.33, n.1, p. 39–42, 1995.
- GONÇALVES, S. B. et al. **Substâncias tóxicas,alergênicas e antinutricionais presentes no Pinhão Manso e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio**. Brasília: EMBRAPA Agroenergia , 2009, 5p.
- GONZALEZ, S; et al. An extract of the fern *Polypodium leucotomos* (Difur) modulates Th1/Th2 cytokines balance *in vitro* and appears to exhibit anti-angiogenic activities *in vivo*: pathogenic relationships and therapeutic implications. **Anticancer Research**, p.567-575, 2003.
- GOONASEKERA, M.M. et al. Pregnancy terminating effect of *Jatropha curcas* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.47, n.3, p.117-123. 1995.
- HAMILTON, R.G. et al. Clinical and laboratory-based methods in the diagnosis of natural rubber latex allergy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.110, n.2, p.47-56, 2002.
- HASINA, R.; LINGEN, M.W. Angiogenesis in Oral Cancer. **Journal of Dental Education**, n.65, p.1282 – 1290, 2001
- HENCH, L. Biomateriais: uma introdução. In: ORÉFICE, R.L., MAGALHÃES, M.M., MANSUR, H.S., eds. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro:Cultura Médica, p.1-7, 2006.
- HERRERO, O. et al. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. **Mutation Research**. v.743, p.20-24, 2012
- HOEBEN, A. et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacol Review**, n.56, p.549-80, 2004
- IGBINOSA, O.O. et al. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extrats from *Jatropha curcas* L. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.3, n.2, p.58-62, 2009.
- International Organization for Standardization. **ISO 10993: Biological evaluation of medical devices – Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity**. Gevene, 2009.
- International Organization for Standardization. **ISO 10993: Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for *in vitro* citotoxicity**. Gevene, 2009.
- KAO, C.T. et al. The cytotoxicity of orthodontic metal bracket immersion media. **European Journal of Orthodontics**, v. 29, n. 2, p.198-203, 2011.

- KATRANCIOGLU, N. et al. The antiangiogenic effects of levosimendan in a CAM assay. **Microvascular Research**, n.83, p.263–266. 2012.
- KONNO, K. et al. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant Journal**, v.37, p.370-378, 2004.
- KRISHNAN, P. R.; PARAMATHMA., M. Potentials and *Jatropha* species wealth of India. **Scientific Correspondence**, v.97, n.7, p.1000-1004, 2009.
- LAVIOLA, B. G. et. al. Diversidade genética em banco de germoplasma de pinhão manso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 5., 2009, Guarapari. *Anais...* Vitória: INCAPER, 2009. 1 CD-ROM.
- LEME, D.M.; MARIN-MORALES M.A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p.71-78. 2009.
- LIBERALINO, A. et al. *Jatropha curcas* L. seed: Chemical analysis and toxicity. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.31, n.4, p.539-550. 1998.
- LUCIO NETO, M.P. Avaliação Tóxica, Citotóxica, Genotóxica e Mutagênica do Composto 3-(2-cloro-6-fluorobenzil)-imidazolidina-2,4-diona em Células Eucarióticas. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Piauí, PI: UFPI, 2011. 128p.
- MAIA, M. et al. Reconstrução da estrutura facial por biomateriais: revisão de literatura, **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v.25, n.3, p.566-572, 2010.
- MAKKAR, H.P.S. et al. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food Chemistry**, v.62, n.2, p.207-215, 1998.
- MARTINS, C.C. et al. Temperatura e substrato para o teste de germinação em sementes de pinhão-manso. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v. 32, n.3, p.863-868, 2008.
- MATOS, F. S. et al. Physiological characterization of leaf senescence of *Jatropha curcas* L. populations. **Biomass and Bioenergy**, Elsevier v.45, p. 57-64, 2012.
- MAY, A.E. et al. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.28, n.3, p.5-10, 2008.
- MELO-REIS, P.R.; et al. Angiogenic activity of *Symadenium umbellatum* Pax latex. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 189-194, 2010.
- MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B.G. **Uso Potencial e Toxidez da Torta de Pinhão-manso**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. 8p.
- MISSIRLIS, E. et al. Angiogenesis is associated with collagenous protein synthesis and degradation in the chick chorioallantoic membrane. **Tissue Cell**, n.22, p.419-426. 1990.

MITCHELL, R.N. Disfunções hemodinâmicas, doenças trombo-embólica e choque. In: ROBBINS & COTRAN (Ed.) Patologia – bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592p.

MITRAGOTRI, S.; LAHANN, J. Physical Approaches to Biomaterial Design. **Nature Materials**, v.8, n.1 p.15-23, 2009.

NAYAK, B.S.; PATEL, K.N. Anti-inflammatory screening of *Jatropha curcas* root, stem and leaf in albino rats. **Romanian Journal Biology – Plant Biology**, v.55, n.1, p. 9–13, 2010.

NEGRELLE, R.R.B. et al. Estudo etnobotânico junto à Unidade Saúde da Família Nossa Senhora dos Navegantes: subsídios para o estabelecimento de programa de fitoterápicos na Rede Básica de Saúde do Município de Cascavel (Paraná). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.6-22, 2007.

OLIVEIRA, L.B.O. et al. Angiogênese e tumorigênese: onde ocorre a intersecção e as possibilidades de terapias. **Vittalle**, Rio Grande, v.22, n.2, p.11-22, 2010.

ORÉFICE, R.L. et al. **Biomaterias: Fundamentos & Aplicações**. Rio de Janeiro:Cultura Médica, 2006, 537p.

OSKOUÉIAN, E. et al. Bioactive compounds and biological activities of *Jatropha curcas* L. Kernel meal extract **International Journal Molecular Sciences**, v.12, p.5955-5970, 2011.

OSONLYI, O.; ANAJOBI, F. Coagulant e antcoagulant activities in *Jatropha curcas* latex. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, p.101-105, 2003.

PAMIDIMARRI, D.V.N.S. et al. Molecular characterization and genetic diversity analysis of *Jatropha curcas* L. in India using RAPD and AFLP analysis. **Molecular Biology Report**, v.37, n.5, p.2249-2257, 2010.

PANDA et al. Dose-dependent metabolism, therapeutic effect, and toxicity of anticancer drugs in man. **Drug Metabolism Review**.v.14, p.1145-1163, 2005.

PAVLETIC, M.M. **Atlas of small animal wound management and reconstruticve sugery**. 3 ed. Iowa:Wiley-Blackwell, 2010. 720p.

PORTIS, I.G. et al. Determinação da Mutagenicidade do Tebuconazole em Sistema Teste Vegetal. 2ª REUNIÃO BRASILEIRA DE CITOGENÉTICA. Águas de Lindóia : [s.n.]. 2011.

RATNER, B.D. et al. **Biomedical Engineering Desk Reference**, London: Academic Press, 2009, 816p.

RIBEIRO, S.S. et al. Evaluation of the cytotoxic activity of some brazilian medicinal plants. **Planta Medica**, v.78, p. 1601-1606, 2012.

RICCI, A. et al. Molecular Characterization of *Jatropha curcas* Resources and Identification of Population-Specific Markers. **Bioenergy Research**, v.5, n.1, p.215– 224, 2012.

RISAU, W. Mechanisms of angiogenesis. **Nature**, v.386, n.6626, p.671-674, 1997.

RONCO, A. et al. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**, Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, cap.1, 2004.

ROSADO, T.B. et al. **Avaliação da diversidade genética do banco de germoplasma de pinhão-mansão por marcadores moleculares**, Brasília: EMBRAPA Agroenergia, 2009, 16p.

SATURNINO, H. M. et al. Cultura do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.26, n.229, p.44-78, 2005.

SEMENZA, G.L. Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. **Journal of Internal Medicine**, v.41, p.79-83, 2002.

SIRISOMBOON, P. et al. Physical and mechanical properties of *Jatropha curcas* L. fruits, nuts and kernels. **Biosystems and Engineering**, v.97, p.201-207, 2007.

SIRITIENTONG, T. et al. Clinical potential of a silk sericin-releasing bioactive wound dressing for the treatment of split-thickness skin graft donor sites. **Pharmaceutical Research**, v.31, n.1, p.104-116, 2014.

SOARES, A.K.A. et al. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p.447-454, 2006.

STOCKMANN, C. et al. The Impact of the Immune System on Tumor: Angiogenesis and Vascular Remodeling. **Frontiers in Oncology**, Lausanne, v.4, p.69, 2014.

SUJATA, M. et al. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnology Advance**, v.26, p.424-435, 2008.

SUJATHA, M. et al. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnology Advances**, v.26, p.424-435, 2008.

THE TAXONOMICON. Taxon: *Jatropha curcas*, Disponível em: <<http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=96913&tree=0.1&syn=1>> Acessado dia 07/11/14.

THOMAS, R. et al. Therapeutic biology of *Jatropha curcas*: a mine review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.9, n.4, p.315-324, 2008.

TKALEC, M. et al. Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination, root meristematic cells of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, v.672, n.2, p.76-81, 2009.

TSUZTNSKI, G.P.; NICOSIA, R.F. The role of thrombospondin-1 in tumor progression and angiogenesis. **Bioassays**, v.18, p.71-76. 1996.

VEERAMANI, V. P.; VENI, G. An essential review on current techniques used in angiogenesis assays. **International Journal Pharmtech Research**, India, v.2, n.4, p.2379-2387, 2009.

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

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