



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

ISTEURIA CRISTINA PAULA SANTOS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTIANGIOGÊNICA,
MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DA QUIINA-DO-CERRADO (*Strychnos
pseudoquina*)**

Goiânia - GO

2022

ISTEURIA CRISTINA PAULA SANTOS

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTIANGIOGÊNICA,
MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DA QUINA-DO-CERRADO (*Strychnos
pseudoquina*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu*, Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis.

Goiânia - GO

2022

Catálogo na Fonte - Sistema de Bibliotecas da Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Márcia Rita Freire - Bibliotecária - CRB1/1551

S237a Santos, Isteuria Cristina Paula
Avaliação das atividades angiogênica, antiangiogênica,
mutagênica e antimutagênica da quina-do-cerrado (Strychnos
pseudoquina) / Isteuria Cristina Paula Santos. --
2022.

79 f.: il.

Texto em português, com resumo em inglês.

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade
Católica de Goiás, Escola de Ciências Médicas e da
Vida, Goiânia, 2022.

Inclui referências: f. 63-71.

1. Mutagênese. 2. Testes de mutagenicidade. 3.
4. Quina-do-cerrado. I. Reis, Paulo Roberto de Melo -
1954-. II. Pontifícia Universidade Católica de Goiás
- Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais
e Saúde - 14/03/2022. III. Título.

CDU: 575.224(043)

633.885(043)

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS.

No dia 14 de março de 2022, às 08h00 via webconferência em plataforma digital, de acordo com a portaria 36/2020 CAPES, **ISTEURIA CRISTINA PAULA SANTOS**, discente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Saúde (PPGCAS) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, expôs, em Sessão Síncrona e Remota de Defesa de Dissertação de Mestrado, o trabalho intitulado **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTIANGIOGÊNICA, MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DA QUINA-DO-CERRADO (STRYCHNOS PESEUDOQUINA)**, para Comissão de Avaliação composta pelas docentes: **Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis** (Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Presidente da Comissão), **Profa. Dra. Lee Chen Chen** (Universidade Federal de Goiás, Membro Convidado Externo), **Profa. Dra. Valéria Bernadete Leite Quixabeira** (Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Membro Convidado Interno) e **Profa. Dra. Kátia Karina de Oliveira Moura** (Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Membro Convidado - Suplente). O trabalho da Comissão de Avaliação foi conduzido pelo(a) docente Presidente que, inicialmente, após apresentar os docentes integrantes da Comissão, concedeu **até 30 minutos** ao(a) discente candidato(a) para que este(a) expusesse o trabalho. Após a exposição, o(a) docente Presidente concedeu a palavra a cada membro convidado da Comissão para que estes arguissem o(a) discente candidato(a). Após o encerramento das arguições, a Comissão de Avaliação, reunida isoladamente, avaliou o trabalho desenvolvido e o desempenho do(a) discente candidato(a) na exposição, considerando a trajetória deste(a) no curso de mestrado. Como resultado da avaliação, a Comissão de Avaliação deliberou pela:

Aprovação da Dissertação

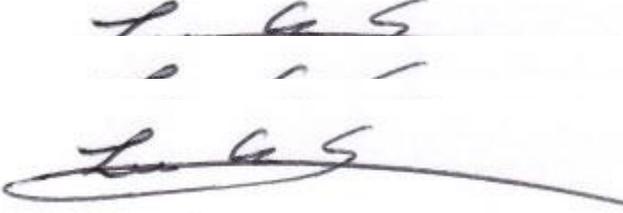
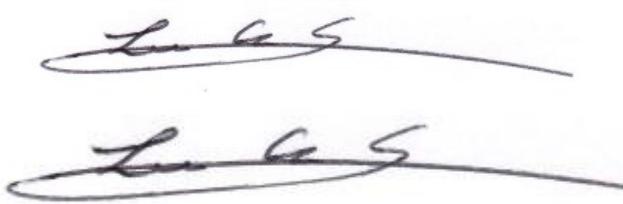


A Banca Examinadora considerou o(a) estudante APROVADO(A). A Comissão de Avaliação pode sugerir alterações de forma e/ou conteúdo considerado aceitáveis, não impeditivo da aprovação do trabalho. As alterações deverão ser indicadas no Anexo ao presente documento e/ou podem constar na versão lida pelo membro da Comissão de Avaliação para a sessão de defesa da dissertação. Neste caso, a versão lida corrigida deverá ser entregue ao(a) discente candidato(a) no final da sessão. O(A) discente candidato(a) terá o prazo de sessenta (60) dias para os ajustes e entrega da versão final na Secretaria do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Ambientais e Saúde, contado a partir da data da sessão de defesa da dissertação.

Reprovação da Dissertação



A Banca Examinadora considerou o(a) estudante REPROVADO(A). A Comissão de Avaliação determina que o trabalho apresentado não satisfaz as condições mínimas para ser considerado dissertação de mestrado válida à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde.

A Comissão de Avaliação (Assinaturas):	Para uso da Coordenação/Secretaria do PPGCAS:
	
	<p align="center">Prof. Dr. Leonardo Luiz Borges Coordenador do Programa de Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> em Ciências Ambientais e Saúde Pontifícia Universidade Católica de Goiás</p>
	<p>Observações:</p> <p>Conforme normas institucionais esta banca de defesa ocorreu de forma síncrona e remotamente por meio de webconferência e a participação de todos os membros avaliadores é atestada pelo Presidente da Banca.</p> <p>1. O Presidente da Banca deverá informar qual recurso foi utilizado para realização da banca.</p>



**PUC
GOIÁS**



	2. () Skype 3. () Microsoft Teams 4. (X) Outro(s) informar – Google Meet
 Profa. Dra. Valéria Bernadete Leite Quixabeira Membro Convidado Interno Pontifícia Universidade Católica de Goiás	
Profa. Dra. Kátia Karina de Oliveira Moura Membro Convidado Suplente Pontifícia Universidade Católica de Goiás	

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS.

Discente: ISTEURIA CRISTINA PAULA SANTOS

Título da Dissertação AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, ANTIANGIOGÊNICA, MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DA QUINA-DO-CERRADO (STRYCHNOS PESEUDOQUINA)

Data do exame: 14 de março de 2022, às 08h00

Correções; modificações; alterações; comentários; observações; pontos para reformulação etc. (Assinatura obrigatória).

Prof. Dr. Paulo Roberto de Melo Reis (Membro Presidente) | **Assinatura:** _____

Assinale em caso afirmativo: [___] O exemplar lido para o exame foi entregue ao discente com as correções necessárias.

Observações adicionais (Opcional):

Profa. Dra. Lee Chen Chen (Membro Convidado Externo) | **Assinatura:** _____

Assinale em caso afirmativo: [___] O exemplar lido para o exame foi entregue ao discente com as correções necessárias.

Observações adicionais (Opcional):



--

Profa. Dra. Valéria Bernadete Leite Quixabeira (Membro Interno) | **Assinatura:** _____
Assinale em caso afirmativo: [] *O exemplar lido para o exame foi entregue ao discente com as correções necessárias.*

Observações adicionais^(Opcional):

Profa. Dra. Kátia Karina de Oliveira Moura (Membro Suplente) | **Assinatura:** _____
Assinale em caso afirmativo: [] *O exemplar lido para o exame foi entregue ao discente com as correções necessárias.*

Observações adicionais^(Opcional):

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, que tem sido comigo em todos os momentos dessa jornada. Aos meus pais Sidneila Lázara de Paula e Geneci Marcos Santos, que nunca medem esforços para que possa realizar os meus sonhos, e por todo apoio e amor incondicional. À minha amada irmã, Nikary Stéfany Paula Santos, que esteve ao meu lado durante todo tempo, me auxiliando no laboratório e na vida. À minha pedra preciosa, amada e eterna vovó, Esmeralda Lázara de Paula (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guardar e proteger durante todo esse processo de aprendizado, sempre me guiando e abençoando quando tudo parecia difícil.

À minha mãezinha, Sidneila Lázara de Paula, por seu amor e carinho incondicional, por sempre me dar palavras de ânimo quando me sentia desanimada, e por estar em suas orações constantes.

Ao meu paizinho, Geneci Marcos Santos, por todo apoio e carinho, por sempre cobrar para que descansasse quando me sentia esgotada, e me lembrando sempre de que sentem muito orgulho de mim.

À minha melhor amiga, irmã e biomédica, Nikary Stéfany Paula Santos, que me auxiliou durante os experimentos no laboratório, e me ajudou na jornada como irmã, sempre apoiando minhas decisões e sendo meu braço direito na vida.

À minha vovó, Esmeralda Lázara (*in memoriam*), que esteve comigo no início desta trajetória, sempre ligando para ver como estava, por me apoiar e ser minha melhor amiga. Amava vê-la super interessada nos experimentos deste trabalho, que a propósito, amou saber como funcionavam. Sei que está comigo no fim desta jornada, me dando forças e me protegendo.

Ao meu professor e orientador, Paulo Roberto de Melo Reis, por todo apoio e incentivo durante a realização desse trabalho. Sempre disponível, e nunca mediu esforços para a construção do mesmo. Obrigada professor por toda sabedoria e conhecimento transmitido.

Ao professor Clever Gomes Cardoso, por sempre se disponibilizar, e por me auxiliar nas análises histológicas.

À toda equipe e professores do LEB (Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos) da área V da PUC – GO.

Aos meus amigos e alunos da Iniciação Científica, Janaina Maria Silva dos Reis, Rodrigo Emmanuel Pereira Borges e Sarah Carvalho Talone, por colaborarem com a realização dos experimentos com os ovos embrionados de galinha, e por deixarem as tardes no laboratório mais leves e divertidas.

À mestre Monatha Nayara Guimarães Teófilo, pelo auxílio, conhecimento e tempo cedido para me ensinar da melhor forma o processo de histologia das amostras.

Ao meu amigo do mestrado Wilson Pereira de Queiroz, por sempre incentivar, apoiar e trocar conhecimento quando surgiam dúvidas e receios durante esse processo de aprendizado.

À professora Dra. Lee Chen Chen, por ceder o Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese, da Universidade Federal de Goiás para a realização de experimentos.

Ao doutorando e colega, Abel Vieira de Melo Bisneto, por todos ensinamentos e tempo cedido para me auxiliar com os experimentos de mutagenicidade.

À Banca Examinadora, que gentilmente aceitou o convite para avaliar essa dissertação de Mestrado.

RESUMO

A *Strychnos pseudoquina* é uma planta muito utilizada na medicina tradicional, através da utilização de suas folhas e cascas dos caules no tratamento de enfermidades, como, febres intermitentes, no tratamento da malária, problemas hepáticos, estomacais e anemia. Apesar das atividades benéficas, grande parte das espécies do gênero *Strychnos* são tóxicas e apresentam dados limitados na literatura. Diante disso, o presente estudo visou investigar as possíveis atividades angiogênicas e antiangiogênicas da *Strychnos pseudoquina* através da realização de testes laboratoriais “in vivo”, utilizando a membrana corioalantóide do ovo embrionado de galinha como modelo experimental; investigar o potencial mutagênico e antimutagênico da *Strychnos pseudoquina* através da realização do teste de mutagenicidade de Ames com a cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*. Para a realização dos testes de angiogênese, foram utilizadas três concentrações da solução aquosa da casca de *Strychnos pseudoquina*: 15mg/mL, 30mg/mL e 60 mg/mL. As concentrações de 15mg/mL, 30mg/mL e 60mg/mL apresentaram uma média de 15,4%, 17,1% e 17,2% de vascularização na devida ordem, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo e inibidor, os quais apresentaram uma média de 8,9% e 2,2%, respectivamente. Para a avaliação da mutagenicidade, as concentrações de *S. pseudoquina* de 10mg/placa, 5mg/placa, 2,5mg/placa, 1,25mg/placa e 0,62mg/placa, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo. Na análise antimutagênica, as concentrações de *S. pseudoquina* tratadas com azida sódica não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao controle positivo. Conclui-se que a solução aquosa da *S. pseudoquina* apresentou atividade angiogênica nas concentrações de 15, 30 e 60mg/mL e não apresentou ação mutagênica e antimutagênica nas concentrações testadas com a cepa TA100.

Palavras-chave: *Strychnos pseudoquina*, Angiogênese, Membrana corioalantóide, Mutagenicidade.

ABSTRACT

Strychnos pseudoquina is a plant widely used in traditional medicine, through the use of its leaves and stem bark in the treatment of diseases such as intermittent fevers, in the treatment of malaria, liver and stomach problems and anemia. Despite the beneficial activities, most species of the genus *Strychnos* are toxic and have limited data in the literature. Therefore, the present study aimed to investigate the possible angiogenic and antiangiogenic activities of *Strychnos pseudoquina* by carrying out “in vivo” laboratory tests, using the chorioallantoic membrane of the embryonated chicken egg as an experimental model; to investigate the mutagenic and antimutagenic potential of *Strychnos pseudoquina* by performing the Ames mutagenicity test with *Salmonella typhimurium* strain TA100. For the accomplishment of the angiogenesis tests, three concentrations of the aqueous solution of the bark of *Strychnos pseudoquina* were used: 15mg/mL, 30mg/mL and 60 mg/mL. The concentrations of 15mg/mL, 30mg/mL and 60mg/mL presented an average of 15.4%, 17.1% and 17.2% of vascularization in the proper order, showing a significant difference ($p < 0.05$) in relation to the negative control and inhibitor, which presented an average of 8.9% and 2.2%, respectively. For the assessment of mutagenicity, *S. pseudoquina* concentrations of 10mg/plate, 5mg/plate, 2.5mg/plate, 1.25mg/plate and 0.62mg/plate, showed no significant difference ($p > 0.05$) compared to the negative control. In the antimutagenic analysis, the concentrations of *S. pseudoquina* treated with sodium azide showed no significant difference ($p > 0.05$) in relation to the positive control. It was concluded that the aqueous solution of *S. pseudoquina* showed angiogenic activity at concentrations of 30mg/mL and 60mg/mL and did not present mutagenic and antimutagenic action at the concentrations tested with the TA100 strain.

Keywords: *Strychnos pseudoquina*, Angiogenesis, Chorioallantoic membrane, Mutagenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição Da família Loganiaceae no mundo.....	20
Figura 2. Árvore, caule, frutos e folhas da espécie <i>Strychnos pseudoquina</i>	22
Figura 3: Árvore da espécie <i>Strychnos pseudoquina</i>	23
Figura 4: Folhas de <i>Strychnos pseudoquina</i>	24
Figura 5: Flores brancas da <i>Strychnos pseudoquina</i>	24
Figura 6: Frutos da <i>Strychnos pseudoquina</i>	25
Figura 7: Frutos da <i>Strychnos pseudoquina</i> , Minas Gerais.....	25
Figura 8: Registros de Ocorrências da <i>Strychnos pseudoquina</i> no Brasil de acordo com o Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBR).....	26
Figura 9: Estruturas químicas da nor-dihidrotoxiferina da <i>S. pseudoquina</i>	27
Figura 10: Estruturas químicas da quercetina 3-O-metil éter (a) e estricnobiflavona (b).....	28
Figura 11. Ilustração da angiogênese por brotamento e intussuscepção.....	32
Figura 12. Ilustração tridimensional da formação de vasos sanguíneos.....	33
Figura 13. Bioquímica da angiogênese.....	34
Figura 14: Teste de Ames em cepas de <i>Salmonella tiphimurium</i>	38
Figura 15: Abertura da casca do ovo com o auxílio de uma micro retífica.....	44
Figura 16: Exposição da CAM vascularizada após a retirada da membrana da casca.....	45
Figura 17: Ovos vedados com fita adesiva, prontos para incubação até o 13° dia.....	45
Figura 18: Ovos no 16° dia preenchidos com solução formol 3,7% até a abertura da casca minutos.....	46
Figura 19: Gráfico Box-Plot da percentagem da área vascularizada da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha após tratamento com solução aquosa de <i>S. pseudoquina</i> e os controles.....	52
Figura 20: Análise de imagens da rede vascular neoformada em membrana corioalantóide (MCA) de ovos após tratamento com respectivos controles e testes, através do software imageJ.....	53
Figura 21: Fotomicrografia das lâminas histológicas da rede vascular neoformada em membranas corioalantóide (MCA) de ovos após tratamento com respectivos controles e testes.....	55
Figura 22: Fotomicrografia do corte histológicos da MCA tratada com a solução de 30mg/mL de <i>Strychnos pseudoquina</i>	56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Percentagem da vascularização da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha após tratamento com solução aquosa de *S. pseudoquina* e os controles.....51
- Tabela 2.** Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica do extrato aquoso de *S. pseudoquina* em *Salmonella typhimurium* pelo teste de Ames.....56

LISTA DE QUADROS

Quadro 01. Classificação Taxonômica e distribuição da espécie <i>Strychnos pseudoquina</i>	19
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

OMS	Organização Mundial da Saúde
EAF	Fração alcaloide enriquecida
MeOH	Metanol
PCNA	Antígeno nuclear de células em proliferação
SEAE	Acetato de etila
3MQ	3- O- metil éter
SBF	Estricnobilavona
SOD	Superóxido dismutase
PCN	Proteínas carboniladas
TGF- β	Fator de crescimento transformador β
IL-10	Interleucina 10
HSV	Herpes-vírus simples
β	Beta
γ	Gama
MCP-1	Proteína-1 quimioatraente de monócitos
CE	Células endoteliais
VEGF-A	Fator de crescimento do endotélio vascular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
TGF-b	Fator de crescimento transformador-beta
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básicos
PA	Ativador do plasminogênio
MMP	Metaloproteinases
MEC	Matriz extracelular

Mg	Miligrama
n	Número
°C	Graus Célsius
%	Porcentagem
®	Marca Registrada
cm	Centímetro
CAM	Membrana Corioalantóide
NaCl	Cloreto de sódio
p/v	Peso por volume
v/v	Volume por volume
µL	Microlitro
=	Igual
g/mL	Gramas por Mililitro
H ₂ O	Água
LEB	Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos
mM	Milimolar
RM	Razão de mutagenicidade
TNF-α	Fator de necrose tumoral-α
IL-8	Interleucina-8
FGF-2	Fator de crescimento de fibroblastos-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
mL	Mililitro
pH	Potencial de hidrogênio
ANOVA	Análise de Variância
RM	Razão de Mutagenicidade
g	Gramas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Taxonomia	19
2.1.1 Família Loganiaceae	19
2.1.2 Gênero <i>Strychnos L</i>	20
2.1.3 Espécie <i>Strychnos pseudoquina</i>	21
2.2 Composição e propriedades químicas da <i>S. pseudoquina</i>	27
2.3 Aplicações medicinais populares e farmacêuticas da <i>S. pseudoquina</i>	29
2.4 Vasculogênese e angiogênese	31
2.5 Antiangiogênese	35
2.6 Mutagênese e antimutagênese	36
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo geral	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4. MATERIAL E MÉTODO.....	41
4.1 Planta <i>Strychnos pseudoquina</i>	41
4.2 Cepa bacteriana	41
4.3 Ovos embrionados de galinha	41
4.4 Materiais e insumos.....	42
4.4.1 Teste da membrana corioalantóide.....	42
4.4.2 Teste de Ames	42
4.5 Procedimento experimental.....	43
4.5.1 Angiogenese e antiangiogênese	43
4.5.2 Análise histológica	47
4.5.3 Mutagênese e antimutagênese	47
4.6 Parâmetros de avaliação	48
4.6.1 Angiogenese e antiangiogênese	48
4.6.2 Mutagênese e antimutagênese	48
4.7 Análise estatística.....	49
4.8 Aspectos éticos.....	49
5. RESULTADOS	51

5.1 Avaliação da atividade angiogênica e antiangiogênica da <i>S. pseudoquina</i>	51
5.2 Análise histológica.....	53
5.3 Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da <i>S. pseudoquina</i>	56
6. DISCUSSÃO.....	58
6.1 Avaliação da atividade angiogênica e antiangiogênica da <i>S. pseudoquina</i> pelo teste da membrana corioalantoide – MCA	58
6.2 Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da <i>S. pseudoquina</i> com <i>Salmonella typhimurium</i> – Teste Ames	60
7. CONCLUSÃO	61
7.1 Perspectivas futuras	61
8. REFERÊNCIAS	62
9. ANEXOS	71
9.1 Protocolo do experimento de angiogênese e antiangiogênese	71
9.2 Técnica de processamento histológico da MCA	72
9.3 Protocolo do experimento de mutagênese e antimutagênese.....	75

1. INTRODUÇÃO

Com cerca de 19% da flora mundial, o Brasil é o país com a flora mais rica do mundo, com cerca de 56.000 espécies de plantas catalogadas (GIULIETTI *et al*; 2005). Dentre essas variedades de espécies, as plantas medicinais têm atraído a atenção de muitos pesquisadores.

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas a muitos séculos, de geração em geração pelas comunidades brasileiras, que detêm o conhecimento tradicional acerca do manejo de sua utilização como remédios caseiros e matéria prima para a confecção de fitoterápicos (LEÃO; FERREIRA; JARDIM, 2007).

Existem dados que mostram a utilização de produtos naturais, como, animais, plantas (casca, frutas, sementes, raízes e folhas) e minerais, a milhares de anos antes de Cristo (CALIXTO, 2019). E diante de muitos estudos sobre a história da medicina, pesquisadores não hesitam em afirmar que, o primeiro terapeuta a fazer uso de plantas para o tratamento de alguma enfermidade no Brasil, teria sido um pajé, através da confecção de chás, bálsamos, vapores, fumaças e inalações.

A unificação dos conhecimentos dos índios logo se associou aos conhecimentos trazidos pelos Europeus, permitindo o desenvolvimento da fitoterapia, o que incentivou ainda mais a utilização de ervas (BRAGA, 2011).

No Brasil, a utilização de plantas antes feita de forma artesanal, passou a se beneficiar através do aprofundamento científico, do aperfeiçoamento de técnicas e métodos que permitiram o melhor proveito da planta. Com isso, vários profissionais como, biólogos, químicos, médicos, biomédicos e bioquímicos, passaram a dedicar seus conhecimentos específicos para contribuir com as pesquisas (BRAGA, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que 60% a 80% da população mundial, principalmente dos países em desenvolvimento (OMS, 1979 *apud* LOPES et al., 2015; FLORIO, 2019) e das grandes áreas rurais, dependem das plantas medicinais em seus cuidados com a saúde, sendo muita das vezes sua única fonte de acesso a algum tipo de tratamento (CHAN, 2015).

Em uma conferência no ano de 2013 em Delhi (Índia), a Diretora Geral da Organização Mundial da Saúde (OMS), Dra. Margaret Chan, afirmou que para garantir o sucesso com relação aos cuidados a saúde das pessoas, os medicamentos tradicionais (fitoterápicos) precisam ter qualidade, segurança, eficácia cientificamente comprovadas e serem culturalmente aceitáveis. Além do fato de que, para milhões de pessoas, medicamentos fitoterápicos e

tratamentos tradicionais são os principais, e por vezes, as únicas fontes de tratamento, devido a acessibilidade e a cobertura universal que eles possuem (CHAN, 2013; WHO, 2013).

As plantas possuem componentes químicos importantes, os quais são os principais responsáveis pela ação terapêutica no organismo. Esses componentes são denominados de princípios ativos, como os flavonoides, cumarinas, vitaminas, óleos essenciais e minerais, por exemplo (BRAGA, 2011). Esses componentes apresentam uma ampla gama de ações biológicas e terapêuticas no organismo humano, como, proteção da radiação UV, atividade antimicrobiana, antiparasitária, antiviral, antifúngica, ação antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica, antitrombótica, vasoprotetora e anticoagulantes (FLAMBÓ, 2013; HARAGUCHI *et al*; 1998; NIJVELDT, 2001; WITAICENIS *et al*, 2014; HOULT, 1996)

Segundo Alan Harvey (2000), os produtos naturais são a fonte mais bem sucedida para o uso terapêutico e produção de drogas. Menos de 10% da biodiversidade mineral e vegetal do mundo foi desbravada como fonte de novos compostos químicos, e cerca de 80% da biodiversidade vegetal mundial ainda não foi pesquisada, portanto, os produtos naturais continuam sendo a maior fonte para o desenvolvimento de novas drogas medicinais (KOEHN; CARTER, 2005; BERNARDINI *et al*; 2018).

Grande parte dos medicamentos comercializados provém de produtos naturais, principalmente as plantas. Em um levantamento no ano de 1988 nos Estados Unidos da América (EUA), entre as vinte drogas mais vendidas, apenas sete não derivavam diretamente de produtos naturais. O Brasil, sendo um dos países com mais biodiversidade do mundo, possui um grande potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos produzidos através de plantas (FERREIRA, 1998).

Com o advento das preocupações globais relacionadas ao meio ambiente e ao desenvolvimento sustentável, a atenção se voltou aos estudos das plantas e suas aplicabilidades medicinais, a fitoterapia (BRAGA, 2011). No entanto, a demanda por esforços e investimento para a pesquisa recai sobre os cientistas e indústrias brasileiras, o que pode ser um grande empecilho (FERREIRA, 1998; KLEIN *et al*; 2009).

No Brasil, o Ministério da Saúde vem inserindo em suas práticas de atenção à saúde, principalmente no Programa Saúde da Família (PSF), a fitoterapia. Tais medidas enfatizam ainda mais a necessidade de mais investimento com relação aos conhecimentos científicos toxicológicos, químicos e farmacológicos (SANTOS, 2011).

No Brasil, o número de estudos acerca das plantas medicinais nos últimos 20 anos tem crescido 8% anualmente (FONSECA, 2012). No entanto, é necessário mais investimento para utilização segura por parte dos profissionais de saúde e estudantes da área, a fim de auxiliar na

implementação segura e eficaz das práticas fitoterápicas no SUS (SANTOS, 2011). Tais pesquisas contribuirão para a identificação de novas plantas, novos alcaloides, novas formas de preparo, indicações, dosagens corretas e seguras, bem como os riscos, grau de toxicidade, ação sinérgica e limitações na utilização das mesmas (VEIGA *et al*, 2005). Contudo, o conhecimento tradicional e a preservação das espécies vegetais devem ser considerados e explorados de forma consciente (ALMEIDA; SCHEFFER, 2012; SANTOS, 2011).

Uma planta muito utilizada popularmente é a *Strychnos pseudoquina* (GONTIJO *et al*; 2018). Trata-se de uma árvore pertencente à família Loganiaceae, nativa do cerrado brasileiro e muito conhecida pelos nomes populares de “quina-quina”, “quina-branca”, “casca aromática” e “Quina do cerrado”. O gênero *Strychnos* inclui mais de 200 espécies distribuídas entre as áreas tropicais do globo (Philippe *et al*; 2004).

Algumas espécies são conhecidas por suas propriedades medicinais e pelo poderoso caráter de toxicidade entre seus fitocompostos (BONAMIN *et al*; 2011). Essa toxicidade se deve a presença de alcaloides no gênero *Strychnos*, que atua através de diferentes mecanismos de toxicidade: estricnina e seus derivados, que são alcaloides terciários que possuem atividade convulsivante (tetanizante) e os alcaloides quaternários, que possuem ação paralisante e são componentes do curare. O curare é o nome dado ao veneno de origem vegetal preparado e utilizado por algumas tribos de índios que vivem nas regiões da América Equatorial (COSTA, 2014 *apud* BISSET, 1992a).

As folhas e cascas da *Strychnos pseudoquina*, são muito utilizadas na medicina popular através da produção de chás obtidos da casca e/ou folhas. No entanto, a casca é a parte que mais chama atenção, por ser utilizada popularmente para tratar comorbidades do sistema gastrointestinal, antipirética, efeito cicatrizante gástrico e principalmente antimalárica, através de um preparo muito amargo, chamado de ‘água Inglesa’ (GONTIJO *et al*; 2018; BONAMIN *et al*; 2011).

A *Strychnos pseudoquina* foi estudada recentemente. E em alguns estudos sobre a casca e as folhas, ambas exibiram caráter mutagênico, efeito citotóxico em testes *in vitro* (BONAMIN *et al*; 2011).

Uma substância é considerada mutagênica quando possui o potencial de aumentar a taxa de mutação do material genético de um organismo (GATEHOUSE *et al*; 1990). E para avaliar a capacidade mutagênica de uma substância, o teste do Ames é amplamente utilizado para identificar os danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) em populações expostas a essas substâncias (MARON & AMES, 1983).

Diversas substâncias de plantas medicinais foram descritas na literatura como mutagênicas e carcinogênicas. Dentre elas estão os alcaloides de pirrolozidina, as hidrazinas, flavonoides, furocumarinas, quinonas, glicosídeos cardiotônicos e teobrominas (KHAN *et al*; 2005).

Em contrapartida, existem substâncias antimutagênicas, as quais apresentam uma capacidade de proteção ao material genético, ou seja, reduz a taxa de mutação induzida ou espontânea do DNA (GONCHAROVA, 1993).

Um ponto interessante a ser avaliado são os vasos sanguíneos, que percorrem todo o corpo, com exceção da córnea avascular e a cartilagem humana. São responsáveis por garantir a homeostase metabólica, fornecendo oxigênio (O₂), nutrientes e a remoção de resíduos, contribuindo para o crescimento e desenvolvimento de órgãos, cicatrização de feridas e reparo tecidual pós-isquêmico (DUARTE; LONGATTO FILHO; SCHMITT, 2007; FOLKMAN, 1985).

Recentemente, o termo “angiogênese” tem sido utilizado para descrever o processo de crescimento e remodelação da rede primitiva em uma rede complexa de vasos sanguíneos. (WINSTON, 2005; CARMELIET, 2011; MAR, 2008; FOLKMAN, 2007). Os processos de angiogênese e anti-angiogênese (inibição do crescimento do vaso) (DUARTE; LONGATTO FILHO; SCHMITT, 2007), são regulados por inúmeros e complexos moduladores, estimuladores e inibidores de angiogênese, que compreendem: fatores de crescimento, que estão envolvidos em quase todo o processo, sendo o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) um dos mais importantes; as proteases; inibidores de protease; citocinas; quimiocinas; e uma ampla gama de moduladores endógenos (GERRITSEN, 2008; WINSTON, 2005).

Todo esse processo de angiogênese, está intimamente ligado a algumas patologias, sendo uma das principais participantes nos processos de doenças, tais como o câncer, a retinopatia diabética, degeneração macular relacionada à idade, artrite reumatoide, endometriose e psoríase. A ausência ou a insuficiência dos vasos contribui para outros problemas, como enfartes após um ataque cardíaco, acidente vascular encefálico (AVE) e doenças resultantes de má circulação (FAN, *et al*; 2006; GERRITSEN, 2008).

Neste sentido, a literatura tem demonstrado que alguns produtos de origem vegetal têm apresentado substâncias com capacidades de angiogênese e antiangiogênese. E com o objetivo de promover angiogênese ou sua inibição, inúmeros fármacos derivados de plantas têm sido desenvolvidos (CHAVES, 2015).

Para a análise da atividade angiogênica e antiangiogênica, o teste com ovos embrionados de galinha a partir da análise da membrana corioalantóide (CAM), é uma ferramenta poderosa

e amplamente utilizada como um sistema “in vivo” além de ser um indicador da morfologia do vaso (FAITH *et al*; 2020). A CAM oferece a vantagem de ser relativamente barata e permite um estudo em larga escala, usando vários estimuladores sozinhos ou em combinação com um agente inibidor para examinar a eficácia de alguma substância. (RIBATTI, 2010).

Algumas plantas possuem a capacidade de induzirem a formação de vasos sanguíneos, como é o caso da *Euphorbia tirucalli* (aveloz) (BESSA, 2010) e *Tabebuia impetiginosa* (Ipê roxo) (MORAES, 2015).

Com os crescentes incentivos para o desenvolvimento de pesquisas de plantas utilizadas popularmente sem comprovação científica da eficácia, segurança e de suas potenciais aplicações, bem como o incentivo por parte das políticas públicas no Brasil, para a utilização consciente de plantas medicinais e fitoterápicos, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da solução aquosa de *Strychnos pseudoquina* em membranas corioalantóide de ovos embrionados, avaliando possíveis atividades angiogênicas e antiangiogênicas, e possíveis efeitos mutagênicos e antimutagênicos pelo teste de Ames.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Taxonomia

2.1.1 Família Loganiaceae

A família Loganiaceae pertence a ordem Gentianales (Quadro 01), a qual possui uma ampla diversidade e distribuição no mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo então, típicas de ambientes secos e raras em altitudes acima de 3.000 m e em regiões temperadas (ZAPPI, 2006) (Figura 1).

A família Loganiaceae compreende cerca de 13 gêneros, como, *Antonia*, *Bonyunia*, *Gardneria*, *Geniostoma*, *Labordia*, *Logania*, *Mitrasacme*, *Mitreola*, *Neuburgia*, *Norrisia*, *Spigelia*, *Strychnos* e *Usteria*, e aproximadamente 420 espécies (BACKLUND; OXELMAN; BREMER, 2000; MANOEL; GUIMARÃES, 2009).

Quadro 01. Classificação Taxonômica e distribuição da espécie *Strychnos pseudoquina*.

Classificação Taxonômica	
Nome	<i>Strychnos pseudoquina</i> A. St.-Hil.
Sinônimos e Combinações	<i>Strychnos pseudochina</i> Benth. <i>Geniostoma febrifugum</i> Spreng. <i>Strychnos pseudoquina</i> var. <i>longiflora</i> Hassl.
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Gentianales Juss. Ex Bercht. & J. Presl
Família	Loganiaceae R. Br. Ex Mart.
Gênero	<i>Strychnos</i> L.
Espécie	<i>Strychnos pseudoquina</i> A. St.-Hil.
Distribuições	Bolívia (Santa Cruz); NE-Brasil (Maranhão); WC-Brasil (Mato Grosso, Goiás); SE-Brasil (Minas Gerais, São Paulo); Paraguai (Amambay).

Fonte: HASSLER (2021).

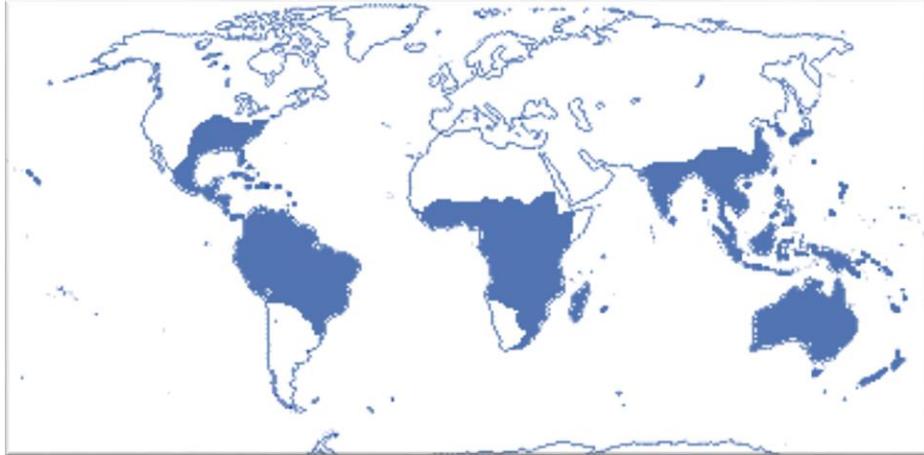


Figura 1. Distribuição da família Loganiaceae no mundo.

Fonte: STEVENS (2017).

As espécies da família Loganiaceae podem ser classificadas em quatro distintos grupos com base na morfologia do fruto, forma de vida e prefloração da corola: Loganieae, *Antonieae*, *Spigeliae* e *Strychneae*. A tribo Loganieae compreende os gêneros *Geniostoma*, *Labordia*, *Logania*, *Mitrasacme* e *Mitreola*, com distribuição na Ásia, Austrália e Pacífico. *Antonieae* é pantropical formada de arbustos ou árvores, com cápsulas secas e sementes aladas. A tribo *Spigeliae* é herbácea, com fruto capsular circunciso na base, e distribuição nas Américas tropical e subtropical. A *Strychneae* compreende três gêneros, *Gardneria*, *Neuburgia* e *Strychnos*, os quais possuem o maior número de espécies, e que compartilham diversas características, como o fruto suculento. No entanto, vale ressaltar que, o monofiletismo, ou seja, o ancestral comum da tribo, é questionável e carece de mais estudos (NURIT; AGRA; BASÍLIO; BARACHO, 2005).

No Brasil, esta família está representada por cerca de 5 gêneros (*Antonia* Pohl, *Bonyunia* M.R. Schomb., *Mitreola* L., *Spigelia* L. e *Strychnos* L.) e cerca de 131 espécies, sendo 68 endêmicas (NURIT; AGRA; BASÍLIO; BARACHO, 2005; MANOEL; GUIMARÃES, 2009 *apud* SOUZA & LORENZI, 2008). Os gêneros *Spigelia* e *Strychnos* são os mais representativos no Brasil, compreendendo 56 e 68 espécies respectivamente (NURIT; AGRA; BASÍLIO; BARACHO, 2005).

2.1.2 Gênero *Strychnos* L

O gênero *Strychnos L* se destaca principalmente por ser um dos maiores e mais importantes gêneros dentro da família Loganiaceae, compreendendo cerca de 200 espécies, as quais podem ser classificadas em três grupos de acordo com sua distribuição geográfica, sendo, um grupo na América Central e do Sul, compreendendo pelo menos 73 espécies, outro grupo na África, com 75 espécies, e por fim, um grupo na Ásia, incluindo Austrália e Polinésia, com cerca de 44 espécies (PHIILIPPE *et al*; 2004 *apud* NEUWINGER, 1996; NURIT; AGRA; BASÍLIO; BARACHO, 2005).

O Brasil é um dos centros de diversidade da *Strychnos L*. Sua ocorrência gira em torno de aproximadamente 61 das 71 espécies do gênero *Strychnos L*. que já foram catalogadas em toda a América (KRUKOFF; BARNEBY, 1969), mas é na Amazônia, especificamente, que se encontra o polo dessa diversidade, com cerca de 43 espécies registradas por Ducke (1955).

O grupo *Strychnos L* é caracterizado por arbustos ou lianas e raramente árvores, as quais podem atingir até 50 metros de comprimento, espinhos cilíndricos de até 3,0 centímetros de comprimento, folhas opostas, 3-7 nervadas; flores frequentemente acompanhadas de bractéola, de quatro a cinco pétalas, perfumadas, cor alva, creme-amarelada ou esverdeada; fruto tipo baga, largo elípticas ou esférico, pericarpo liso com polpa doce; possui de 1, 2 ou numerosas sementes, raramente uma por fruto e possui testa lisa ou levemente rugosa (BRANDÃO; RAPINI, 2018; NURIT; AGRA; BASÍLIO; BARACHO, 2005; ZAPPI, 2006; ZAPPI, 2004).

2.1.3 Espécie *Strychnos pseudoquina*

A *Strychnos pseudoquina* (Loganiaceae) é uma árvore popularmente conhecida como, pau-pra-tudo, quina, quineira, falsa-quina, quina-branca, quina-do-campo e quina-do-cerrado (Figura 2).

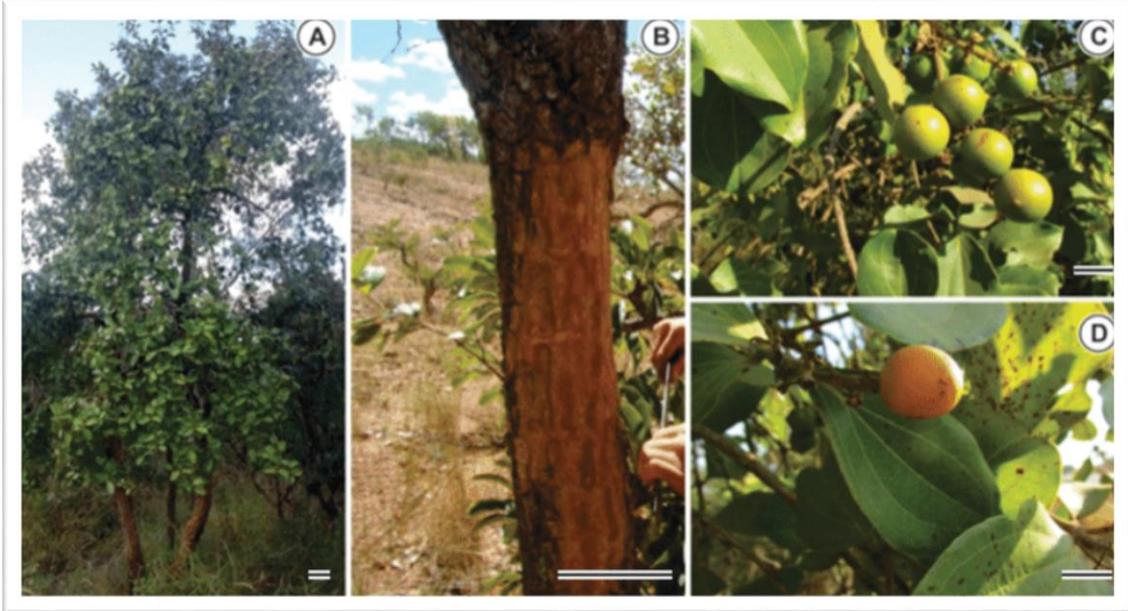


Figura 02. Árvore, caule, frutos e folhas da espécie *Strychnos pseudoquina*. A-árvore, B-caule (cascas amargas), C e D-frutos e folhas

Fonte: BONAMIM *et al.*; (2011).

É uma árvore nativa do cerrado brasileiro, com 4 a 10 metros de altura, tronco grosso e cascudo, com ramos castanhos, cilíndricos, estriados, glabrescentes a vilosos quando jovens, ausência de lenticelas, espinhos e gavinhas (Figura 3). Sua casca é suberosa, possui uma coloração amarelo ocre exteriormente, compacta, dura e cinza na base; possui ramificações numerosas formando uma espécie de copa (DE SAINT-HILAIRE, 2009).

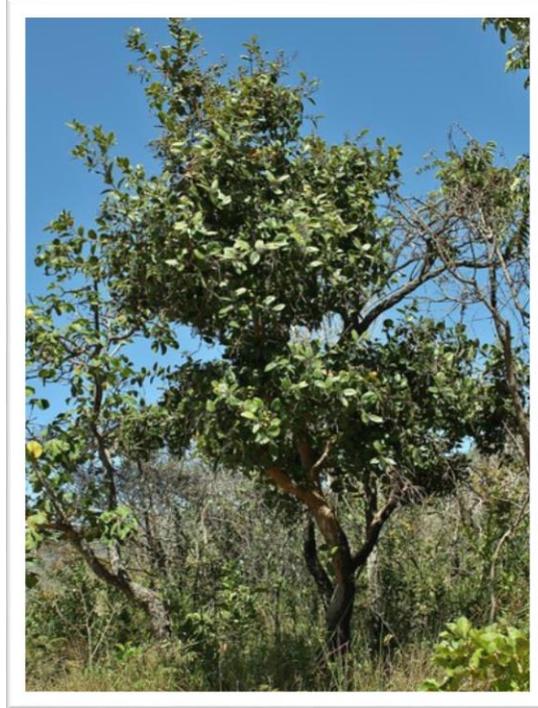


Figura 3: Árvore da espécie *Strychnos pseudoquina*.

Fonte: Mauricio Mercadante. Acesso em: <
<https://search.creativecommons.org/photos/cc24786e-ebcc-4059-a2ab-3a74e982b03f>>

Suas folhas são subsésseis com 5 a 12 cm de comprimento, são rígidas, quebradiças, normalmente apresentam coloração verde-amarelada quando seca, (BRANDÃO; RAPINI, 2018; DE SAINT-HILAIRE, 2009) podem ser ovadas, elípticas a levemente lanceoladas, ápice arredondado, face adaxial com pelos apenas na nervura supra basal, nervuras impressas, face abaxial densamente pilosa, com pelos dourados, nervuras salientes, coriácea, discolor com a face abaxial mais amarelada, 5 enervações, acródroma com nervura supra basal (Figura 4).



Figura 4: Folhas de *Strychnos pseudoquina*

Fonte: Mauricio Mercadante. Acesso em: <

<https://search.creativecommons.org/photos/cc24786e-ebcc-4059-a2ab-3a74e982b03f>>

As flores são brancas ou branco-amareladas, perfumadas, numerosas e reunidas em panículas axilares e florescem de janeiro a fevereiro (Figura 5). Não há nectário. A casca e todas as outras partes da árvore são amargas, com exceção do fruto que é adocicado (DE SAINT-HILAIRE, 2009; KRUKOFF; MONACHINO, 1942).



Figura 5: Flores brancas da *Strychnos pseudoquina*.

Fonte: ZAPPI (2009)

O fruto é do tipo baga (Figura 6), comestível, com 1,0 – 2,0cm de diâmetro, globosa, amarela quando maduro, pericarpo coriáceo, translúcida, 1 a 4 sementes, castanhas, arredondadas e achatadas. Sua época de frutificação é de maio a julho (Figura 7) (BRANDÃO; RAPINI, 2018; Almeida, 1998).



Figura 6: Frutos da espécie *Strychnos pseudoquina*

Fonte: Mauricio Mercadante. Acesso em: <
<https://search.creativecommons.org/photos/cc24786e-ebcc-4059-a2ab-3a74e982b03f>>



Figura 7: Frutos da *Strychnos pseudoquina*, Minas Gerais.

Fonte: ZAPPI (2009)

A *Strychnos pseudoquina* pode ser encontrada no Brasil, Bolívia e Paraguai (ZAPPI, 2006). Vale ressaltar que nenhuma das espécies americanas ocorre na África, Ásia ou Austrália (KRUKOFF; MONACHINO, 1942). No Brasil, ocorre especificamente no Tocantins (Norte), Bahia, Maranhão, Pernambuco (Nordeste), Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso (Centro-oeste), Minas Gerais e São Paulo (Sudeste) (Figura 8) (GUIMARÃES *et al.*, 2015).



Figura 8: Registros de ocorrências da *Strychnos pseudoquina* no Brasil de acordo com o Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr).

Fonte: Sistema da Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). Disponível em: <https://ala-hub.sibbr.gov.br/ala-hub/occurrences/search?q=lsid:335320#tab_mapView>. Acesso em 18 de Jun de 2021.

Segundo Guimarães *et al.* (2015), a espécie *S. pseudoquina* é comumente encontrada nos seguintes domínios fitogeográficos: Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. E eventualmente, em transição para os campos rupestres, crescendo exposta ao sol, sobre solos areno-argilosos ou areno-pedregosos (BRANDÃO; RAPINI, 2018).

2.2 Composição e propriedades químicas da *S. pseudoquina*

A busca por componentes que possam apresentar características tóxicas deve ser investigada para assegurar a segurança e eficácia da utilização da *S. pseudoquina*, visto que grande parte das espécies do gênero *Strychnos* se mostram tóxicas e possuem dados limitados sobre as propriedades biológicas e composição química da espécie, o que não garante o uso seguro desta planta (SILVA *et al*; 2005).

Em uma prospecção fitoquímica realizada no extrato de *S. pseudoquina*, identificou a presença de taninos, flavonoides e alcaloides (NICOLETTI *et al*, 1984; GARAMBONE; ROSA, 2007).

Alcaloides são substâncias nitrogenadas, derivadas de vegetais com capacidade de defesa contra microrganismos e radiação ultravioleta. Os principais alcaloides conhecidos são: cafeína, morfina, quinina, cinchonina, estricnina e outros. Essa classe de compostos é conhecida pela presença de substâncias que possuem ação acentuada no sistema nervoso, sendo muito utilizadas como venenos ou alucinógenos (SILVA, 2011).

A identificação do ácido clorogênico, que se trata de um éster do ácido quínico com o ácido cafeico, demonstrou ser um dos principais constituintes da planta (SARANDY *et al*; 2017), com um potente efeito antioxidante (GARAMBONE; ROSA, 2007).

O isolamento de alguns alcaloides em especial foi realizado em um estudo no ano de 1984, nas folhas de *S. pseudoquina*, identificando a Diabolina e a 11-metoxidiabolina. Grandes quantidades de nor-dihidrotoxiferina da *S. pseudoquina* também foram isoladas, demonstrando uma ocorrência de 6% em toda a casca bruta. (FRANCO *et al*; 1969) (Figura 9).

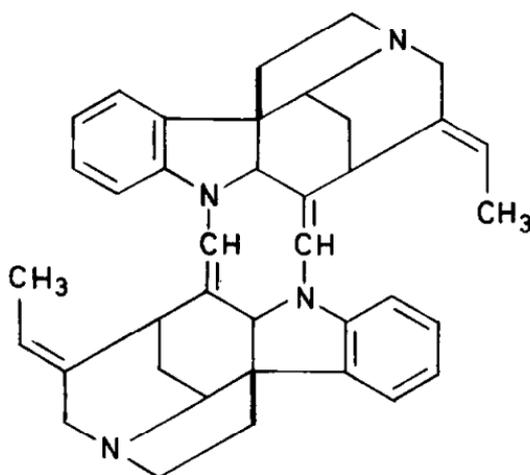


Figura 9: Estruturas químicas da nor-dihidrotoxiferina da *S. pseudoquina*

Fonte: FRANCO *et al*; (1969).

Esta espécie não produz os alcaloides cinchonina ou quinina, mesmo sendo utilizada como substituto do verdadeiro quinina no tratamento da malária (SANTOS, 2006).

Quanto aos flavonoides, presentes principalmente na casca do tronco (MORS *et al*; 2000), temos a estricnobiflavona e isorhamnetina, como exemplos (NICOLETTI *et al*, 1984).

Em um estudo realizado por Lage *et al*; (2013) da casca do caule da *Strychnos pseudoquina*, isolou-se outros dois flavonóides: quercetina 3-O-metil éter e estricnobiflavona (Figura 10). Ambos os flavonoides se mostraram potentes no combate à *Leishmania* em experimentos *in vitro* (LAGE *et al*; 2013), além de anti-inflamatório e antiherpes (BOFF *et al*; 2016).

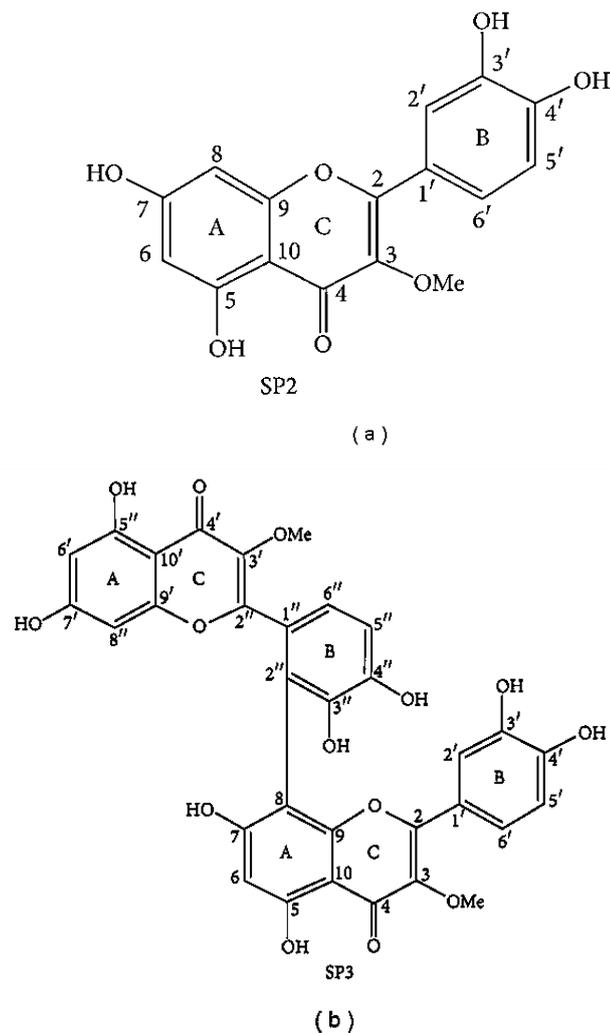


Figura 10: Estruturas químicas da quercetina 3-O-metil éter (a) e estricnobiflavona (b).

Fonte: LAGE *et al* (2003).

Outros dois bioflavonoides foram isolados das folhas da *Strychnos pseudoquina*: kaempferol 3-O-b-rutinoside e a rutina (SILVA *et al*; 2005).

Os flavonoides chamam a atenção por suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antimutagênica (menos frequente) (JURADO *et al*; 1991). Mas existem relatos na literatura sobre a toxicidade dos flavonoides, mesmo que raros e sobre a capacidade mutagênica da maioria dos flavonoides (MOREIRA *et al*; 2002).

Algumas reações adversas, como, hepatite e perda de peso de alguns órgãos como o fígado, quando utilizados flavonoides em doses crônicas foram comprovadas (RIBEIRO *et al*; 2006; JURADO *et al*; 1991). Isso demonstra a importância sobre o conhecimento da composição química detalhada das plantas, e de suas capacidades farmacológicas.

2.3 Aplicações medicinais populares e farmacêuticas da *S. pseudoquina*

A *S. pseudoquina* é uma planta muito utilizada no tratamento de distúrbios orgânicos, como, febres intermitentes, no tratamento da malária, problemas hepáticos, estomacais, anemia, como um poderoso afrodisíaco e em bebidas como tônico (BRANDÃO; RAPINI, 2018). No entanto, sua utilização é baseada apenas em conhecimentos e tradições populares, sem muitos estudos científicos sobre eficácia e segurança da utilização desta planta (DE SAINT-HILAIRE, 2009).

As principais partes da planta que são utilizadas na medicina tradicional são as folhas e as cascas dos caules, seja através de infusões ou em pó (DE SAINT-HILAIRE, 2009).

Um estudo demonstrou que o extrato polar de metanol (MeOH) e da fração alcaloide enriquecida (EAF) de *S. pseudoquina* possuem um efeito antiúlcera e citoprotetor significativo, além da ausência de toxicidade por tratamento agudo, testados em camundongos com lesões gástricas induzidas experimentalmente (SILVA, 2005).

Com o objetivo de elucidar o mecanismo do processo de cicatrização mediado pelo extrato metanólico e sua fração alcaloide enriquecida de *Strychnos pseudoquina* na ulceração gástrica crônica induzida, foi observado que os animais tratados com EAF estimulou alguns fatores proliferativos, aumentando a área regenerativa epitelial e a expressão de núcleos PCNA-positivos (antígeno nuclear de células em proliferação). O número de vasos na mucosa gástrica dos ratos tratados com EAF também revelou um aumento, devido ao estímulo da proliferação de células na região de cicatrização, demonstrando que a ação cicatrizante da fração alcaloide

da *Strychnos pseudoquina* está envolvida na recuperação da vascularização da área ulcerada (BONAMIN, 2011). Logo, concluíram que o EAF de *Strychnos pseudoquina* apresenta expressivo efeito cicatrizante na mucosa gástrica através do aumento da angiogênese, proliferação celular, atividade antioxidante através da expressão da atividade da enzima superóxido dismutase SOD, ação antibacteriana contra *Helicobacter pylori* e ausência de toxicidade ao longo dos 14 dias consecutivos de tratamento pelos animais (BONAMIN, 2011).

O potencial do extrato de acetato de etila de *S. pseudoquina*, e de dois flavonoides purificados a partir dele (quercetin 3-O-methyl ether e strychnobiflavone), demonstrou ser uma alternativa terapêutica de uso isolado ou em associação com outras drogas, no tratamento de doenças provocadas por *L. amazonenses* (LAGE, 2013). Lage também demonstrou em seu estudo, a atividade antileishmania do flavonoide strychnobiflavona isolado da *Strychnos pseudoquina* contra *Leishmania infantum* (LAGE, 2015).

Um estudo sobre a aplicação de pomada a base de extrato de *S. pseudoquina* em feridas induzidas em ratos diabéticos, apresentou efeitos cicatrizantes. O estudo demonstrou a capacidade do tratamento tópico em estimular a celularidade, níveis de Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), colágeno e deposição de fibras elásticas, além de atenuar o dano oxidativo no tecido cicatricial, acelerando o fechamento da ferida, promovendo reparo cutâneo rápido e eficiente. Tal efeito pode estar relacionado aos metabólitos secundários identificados no extrato de *S. pseudoquina*, como, taninos, fenóis simples e ácido clorogênico (SARANDY, 2017).

Outro estudo realizado por Sarandy (2018), demonstrou que pomada com *S. pseudoquina* fechou as feridas cutâneas em ratos de forma rápida. Além de acelerar a cicatrização de feridas, o número de mastócitos, colágeno e fibras elásticas nas feridas dos ratos foram maiores naqueles tratados com a planta. O extrato também estimulou a atividade de enzimas antioxidantes, como, superóxido dismutase (SOD), passando a apresentar níveis elevados, e mantendo baixos níveis de proteínas carboniladas (PCN). A concentração de fator de crescimento transformador β (TGF- β) e Interleucina 10 (IL-10) foi maior no tratamento do extrato liofilizado 5% e extrato liofilizado 10%, do que nos tratamentos com sulfadiazina de prata 1%.

Estudo realizado por Honório-França (2008), objetivou avaliar o efeito hipoglicemiante e cicatrizante de *Strychnos pseudoquina*, que demonstrou capacidade hipoglicemiante em ratos com diabetes induzido pela aloxana, droga diabetogênica. No entanto, o seu uso tópico em microemulsão em lesões induzidas na região dorsal dos ratos diabéticos não apresentou efeito significativo na cicatrização.

Estudo realizado a partir do extrato padronizado de acetato de etila (SEAE) preparado com a casca do caule da planta *Strychnos pseudoquina* e dois compostos isolados obtidos do extrato SEAE, que foram a quercetina 3- O- metil éter (3MQ) e a estricnobilavona (SBF), objetivou avaliar os potenciais efeitos contra o herpesvírus e elucidar o mecanismo de ação dos compostos SEAE e SBF nas etapas do ciclo de replicação do herpes-vírus simples (HSV). Os pesquisadores conseguiram observar que SEAE e SBF interferiram em diversas etapas do ciclo de replicação do HSV, principalmente adsorção, pós-adsorção e penetração, bem como na expressão das proteínas virais β e γ . Observaram também, uma inativação direta das partículas virais. Além disso, os flavonoides 3MQ e SBF inibiram a proteína-1 quimioatraente de monócitos (MCP-1) seletivamente, o que pode beneficiar o desenvolvimento de novos agentes anti-HSV's, e anti-inflamatórias em diferentes níveis, o que é interessante, uma vez que as feridas são acompanhadas por um processo inflamatório (BOFF, 2016).

2.4 Vasculogênese e angiogênese

O processo de oxigenação dos tecidos e eliminação de resíduos do organismo através da circulação sanguínea é de extrema importância para a manutenção fisiológica do organismo (KONTOS; ANNEX, 1999).

A angiogênese e a vasculogênese são os principais processos responsáveis pela formação de novos vasos sanguíneos. Por muitos anos, acreditou-se que, a vasculogênese ocorria somente durante o desenvolvimento embrionário, através de um processo de diferenciação de células precursoras embrionárias, denominadas de angioblastos em células endoteliais (CE), dando início a formação de uma rede denominada plexo vascular primário (RISAU, 1997; RISAU; FLAMME, 1995).

No entanto, estudos tem mostrado que, o desenvolvimento de novos vasos (neovascularização) através do processo de vasculogênese em adultos, pode acontecer. Principalmente em patologias, como a hipóxia (TEPPER *et al*; 2005; ASAHARA *et al*; 1999). Ou seja, não apenas através de vasos pré-existentes, como na angiogênese. Que mesmo assim, é a forma predominante (RIBATTI *et al*; 2001).

A angiogênese é a formação de novos vasos a partir de uma rede vascular pré-existente (CARMELIET, 2000). Esse processo ocorre durante o estágio pré-embrionário, mas, durante a vida adulta, esse processo fisiológico se torna mais raro, restringindo-se a fenômenos, como,

a ovulação no trato reprodutivo feminino durante os ciclos menstruais e durante a gravidez (COUFFINHAL *et al*; 2001; ROBERT; FOLKMAN, 2002). Em contrapartida, em condições patológicas, a angiogênese se faz presente em situações de crescimento tumoral, inflamações crônicas, como, retinopatia diabética, artrite reumatoide e psoríase (FOLKMAN; YUEN, 1992).

A angiogênese terapêutica nos mostra uma gama de aplicações. Alguns exemplos clássicos em que o processo de neoangiogenese se mostra importante, está a melhora da perfusão sanguínea, recuperação de tecidos isquêmicos (cardiopatia isquêmica), cicatrização de feridas (úlceras diabéticas de membros inferiores, ulcerações venosas de perna, úlceras de pressão, úlceras arteriais) e substituição de artérias de grande calibre (YOO; KWON, 2013; YOSHIDA, 2005).

Para que o processo de angiogênese seja ativado, é necessário que ocorra uma desestabilização, uma lesão tecidual nos vasos sanguíneos existentes, como a hipóxia, por exemplo. Essa desestabilização acaba por recrutar e ativar citocinas, fatores de crescimento, além de interações célula-célula e célula-matriz que estimulam as células endoteliais (Ces), as plaquetas, células musculares lisas, monócitos ou macrófagos e fibroblastos a iniciar o processo de angiogênese (BAUER, 2005).

A angiogênese possui dois mecanismos principais e distintos: a angiogênese por brotamento verdadeiro ou germinativa e por intussuscepção ou crescimento microvascular intussusceptivo (CMI) (BURRI *et al*; 2004) (Figura 11).

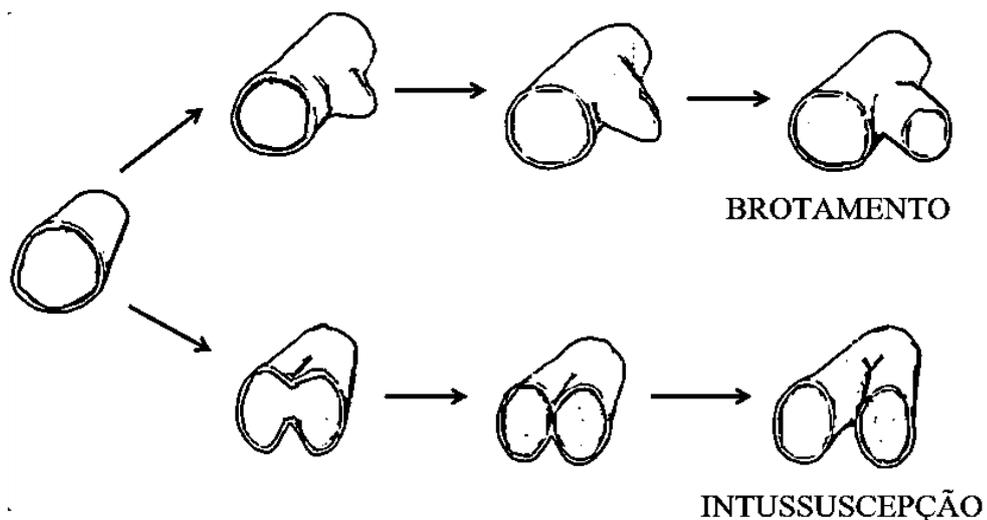


Figura 11. Ilustração da angiogênese por brotamento e intussuscepção.

Fonte: OLIVEIRA *et al* (2010).

A angiogênese por intussuscepção ou angiogênese de divisão, consiste na expansão dos vasos capilares por um fenômeno chamado “crescimento dentro de si mesmo”. Ou seja, caracteriza-se pela formação de pilares de tecido transluminal e subsequente divisão vascular. Esses pilares são formados pela protrusão de células endoteliais capilares opostas no lúmen capilar criando assim uma zona de contato, e subsequente perfuração da bicamada de células endoteliais e aumento da circunferência do pilar formado devido à invasão por miofibroblastos e pericitos, levando ao surgimento de dois vasos (KURZ *et al*; 2003) (Figura 12).

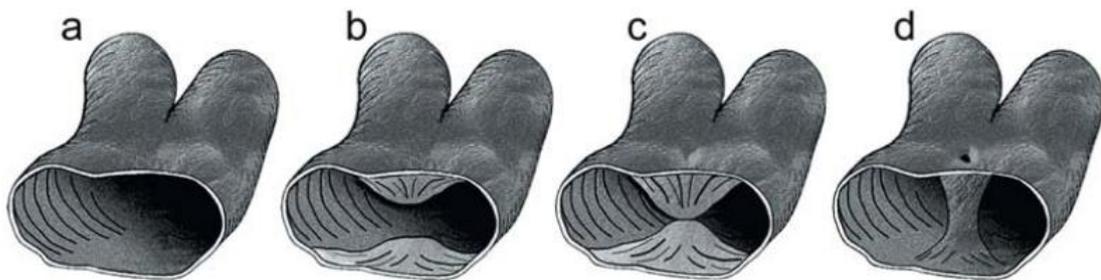


Figura 12. Ilustração tridimensional da formação de vasos sanguíneos. Formação de vasos pela angiogênese intussusceptiva: A; protrusão das paredes capilares opostas no lúmen do vaso A e B; Zona de contato entre as células endoteliais estabelecida C; Por fim, tem-se a perfuração central da bicamada celular, onde as células endoteliais fundidas formam um pilar transluminal D.

Fonte: KURZ *et al*; (2003).

A angiogênese por brotamento, consiste na vasodilatação do vaso e o aumento da permeabilidade vascular para que ocorra o extravasamento de proteínas, que resulta na degradação proteolítica da matriz extracelular, seguida por migração quimiotática e proliferação de células endoteliais, onde ao fim dessas etapas tem-se a formação de brotos (lúmens) sólidos revestidos por células endoteliais conectados a outras redes de vasos (KALEBIC *et al*; 1983; RISAU, 1997).

O principal mediador do início desse processo é o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF-A), que atua como um fator de permeabilidade vascular, o que permite o extravasamento de proteínas aos tecidos (KONTOS; ANNEX, 1999). Além do VEGF, outras citocinas angiogênicas são liberadas, como: o fator de crescimento endotelial vascular A (VEGF-A, B, C, D), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento

transformador-beta (TGF- β) e fator de crescimento de fibroblastos básicos (bFGF) (BRAT; MEIR, 2001).

Em seguida, tem-se a degradação das moléculas da matriz extracelular (MEC) mediada pelo sistema ativador do plasminogênio (PA) e das metaloproteinases (MMP), para que ocorra a migração e proliferação das células endoteliais (CARMELIET, 2000; BAUER, 2005) (Figura 13).

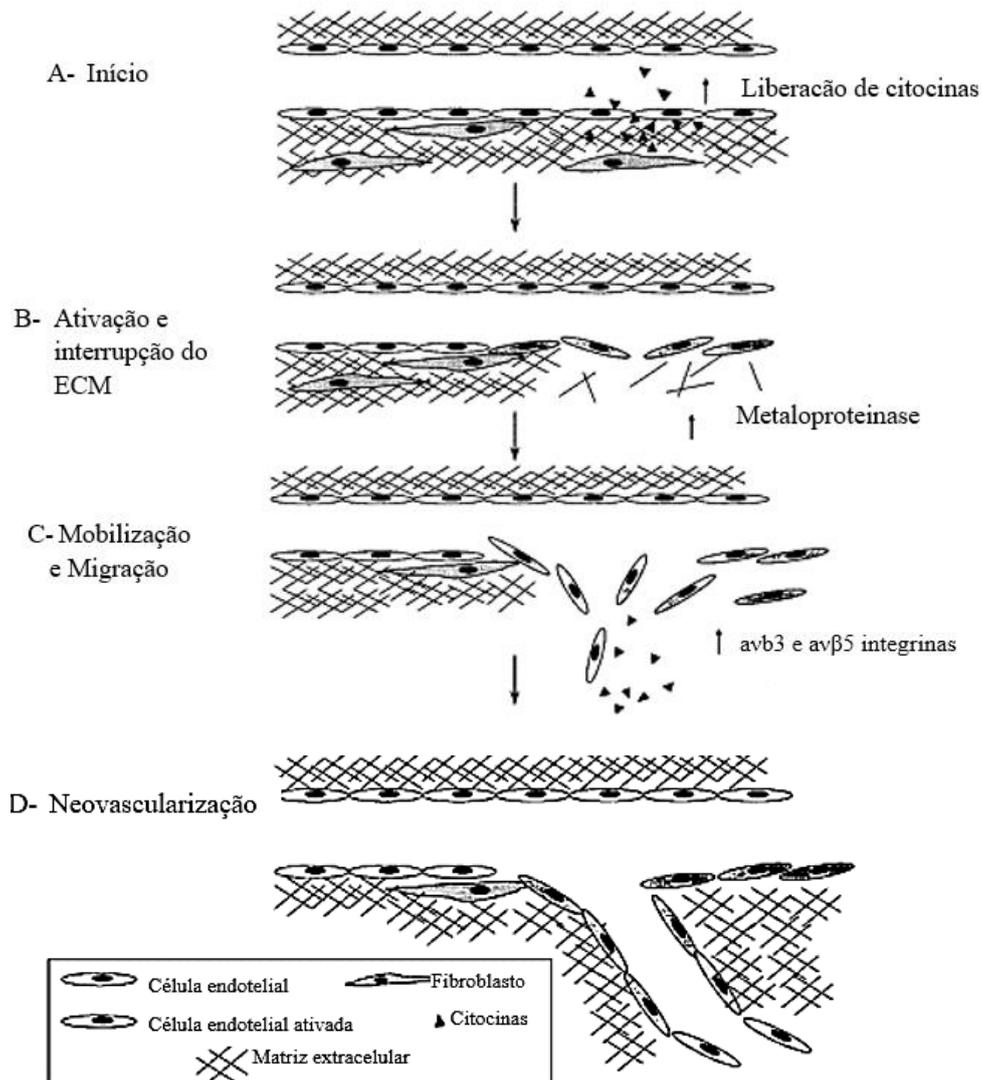


Figura 13. Bioquímica da angiogênese. A. Início da angiogênese através da liberação de citocinas angiogênicas, plaquetas, monócitos e fibroblastos. B. Células endoteliais (CEs) ativadas subsequentemente interrompem suas interações com CEs vizinhas, digerem a membrana basal e outros componentes da matriz extracelular (MEC), liberando metaloproteinases de matriz (MMPs). C. CEs e fibroblastos ativados (mais plaquetas, células

musculares, monócitos e macrófagos) subsequentemente liberam as citocinas angiogênicas necessárias que permitem que as CEs locais invadam e migrem através da MEC e se proliferem. D. CEs formam novos túbulos imaturos.

Fonte: Adaptado de BAUER, 2005.

A angiogênese tem chamado a atenção de pesquisadores, devido sua participação no crescimento de tumores e a metástase, sendo desencadeada por estímulos bioquímicos das células tumorais durante as fases de crescimento, onde esses tecidos tumorais requerem mais oxigênio e nutrientes (FOLKMAN, 1971).

Um dos fatores que justificam a estreita relação entre a angiogênese e os tumores, são que os VEGF's são superexpressos nesses tecidos, estimulando o desenvolvimento novos vasos (YOO; KWON, 2013). A grande preocupação está no potencial metastático aumentado em tumores ricamente vascularizados em comparação com tumores menos irrigados, devido a liberação de células tumorais na circulação sanguínea.

2.5 Antiangiogênese

Além dos fatores indutores da angiogênese, tem sido relatado vários fatores inibidores desse processo, como: Trombospondina, anostatina, endostatina, canstatina, condromobulina1, heparinases, Fato derivado d epitélio pigmentado, ácido retinóico, retinoides, interferon- γ , troponina – derivada da cartilagem, Interleucina: IL-4, IL-12 (BHADADA, 2011). Esses inibidores são moléculas naturais que atuam diretamente nas células endoteliais para bloquear sua migração, proliferação e/ou sua capacidade de formar tubos semelhantes a capilares (KLAUGSBRUN; MOSES, 1999).

A partir desses dados, a angiogênese mostrou-se um quesito de extrema importância em estudos sobre terapias antitumorais através de fatores com efeitos anti-angiogênicos, ou seja, capazes de inibir a formação de vasos sanguíneos (PAPETTI *et al*; 2002). Segundo Pinho (2017), as linhas de estudos com foco em desenvolvimento de drogas são uma das mais promissoras na área de oncologia, como estratégias para inibir o crescimento tumoral e a metástase, bem como uma variedade de patologias oculares (BHADADA, 2011).

Partindo dessa necessidade, muitas pesquisas estão sendo realizadas em busca de plantas com capacidade angiogênica ou antiangiogênica para o desenvolvimento de novos fármacos e novos tratamentos. A *Casearia sylvestris* (BUCKER, 2012), *Stryphnodendron adstringens*

(CHAVES, 2015) e a *Tabebuia impetiginosa* (MORAES, 2015) são alguns dos muitos exemplos.

A pesquisa de plantas com aplicabilidade medicinal anti-angiogênicas tem crescido nos últimos anos. A busca por novas alternativas para o tratamento de patologias, como os tumores, através de fatores inibidores da formação de vasos, uma vez que nos tumores sólidos malignos o VEGF está superexpresso. O que torna a inibição da angiogênese uma estratégia lógica e atrativa no tratamento do câncer, diferentemente dos agentes angiogênicos, que podem potencializar a piora desse quadro, estimulando o crescimento tumoral (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO; 2009).

Algumas preocupações tem surgido no âmbito médico devido ao fato da automedicação indiscriminada pela população, pois muitas vezes, sem o conhecimento do nível de toxicidade dos extratos vegetais, pode ser perigoso se não houver a garantia de que as propriedades farmacológicas esperadas sejam realmente obtidas, sem efeitos colaterais ou adversos perigosos para saúde (JUNIOR, 2008).

2.6 Mutagênese e antimutagênese

O DNA é uma molécula responsável pela perpetuação de informações do organismo, altamente reativa e suscetível a alterações por agentes químicos, físicos e biológicos. Tais alterações podem resultar em mutações através de um processo denominado de mutagênese, o qual desempenha um papel indispensável sobre a manutenção e evolução da vida, bem como, também é responsável por alterações que contribuem para o desenvolvimento de doenças, como o câncer e o envelhecimento (SHILKIN, 2020).

A Mutagenicidade tem sido um tema de grande preocupação na comunidade científica, desde que foi demonstrado potencial carcinogênico, causado por exposição a agentes mutagênicos (ZEIGER, 2019), como, Óxido Nítrico, radicais livres de oxigênio, de origem endógena; ferro e aço de origem ocupacional; produtos naturais presentes na dieta ou gerados durante o cozimento, provenientes da dieta; raios X e exposição a lixo de origem radioativo; pesticidas, efluentes industriais derivados da poluição; e por fim, os originários de infecção por vírus, bactéria ou parasitas, mutagênicos do tipo biológico (RIBEIRO; SALVADORI, 2003; BURCHAM, 1999).

A análise do potencial mutagênico de substâncias é utilizada para proporcionar segurança na utilização das plantas medicinais pela população (STURBELLE *et al*; 2010). Quando utilizado substâncias mutagênicas, o aparecimento de mutações pode aumentar ou ser acelerado, proporcionando o surgimento de neoplasias (RIBEIRO *et al*; 2003).

As mutações podem ser pontuais, ou seja, mutações de genes, onde as bases podem ser modificadas, inseridas ou deletadas; ou mutações cromossômicas, com quebra, rearranjos, ganho ou perda de cromossomos inteiros (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

Já a antimutagênese, é um conjunto de processos com função de garantir a integridade da molécula de DNA, seja contra as influências mutagênicas de agentes endógenos ou exógenos, a fim de evitar alterações deletérias. Seja por sistemas de reparo de alterações no DNA, tolerância a danos, pontos de verificação do ciclo celular ou vias de morte celular (GONCHAROVA, 1993).

A fim de avaliar o potencial mutagênico de algumas substâncias, os Teste de Ames ou Teste de mutagenicidade com *S. typhimurium* foi desenvolvido com o objetivo de identificar substâncias que podem provocar danos que levem a mutação genética.

O teste utiliza diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* com mutações pré-existentes em diversos genes do operon histidina, que as impossibilitam de produzir o aminoácido Histidina, ou seja, são auxotróficas para histidina (His-). E como consequência, as colônias não crescem em um meio sem histidina (MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Todas as cepas são dependentes de histidina em virtude de uma mutação no operon histidina. No entanto, quando expostas a uma substância que possa reverter mutações no operon responsável pela síntese da histidina, ou próximo a ele, o gene pode restaurar sua função, permitindo que as células passem a sintetizar esse aminoácido (Histidina). Desta forma, as bactérias conseguem crescer e formar colônias (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

O número de colônias que cresceram após a exposição das cepas bacterianas *Salmonella typhimurium* a uma gama de concentrações de uma substância estudada é diretamente relacionado com o seu potencial mutagênico (MORTELMANS; ZEIGER, 2000) (Figura 14).

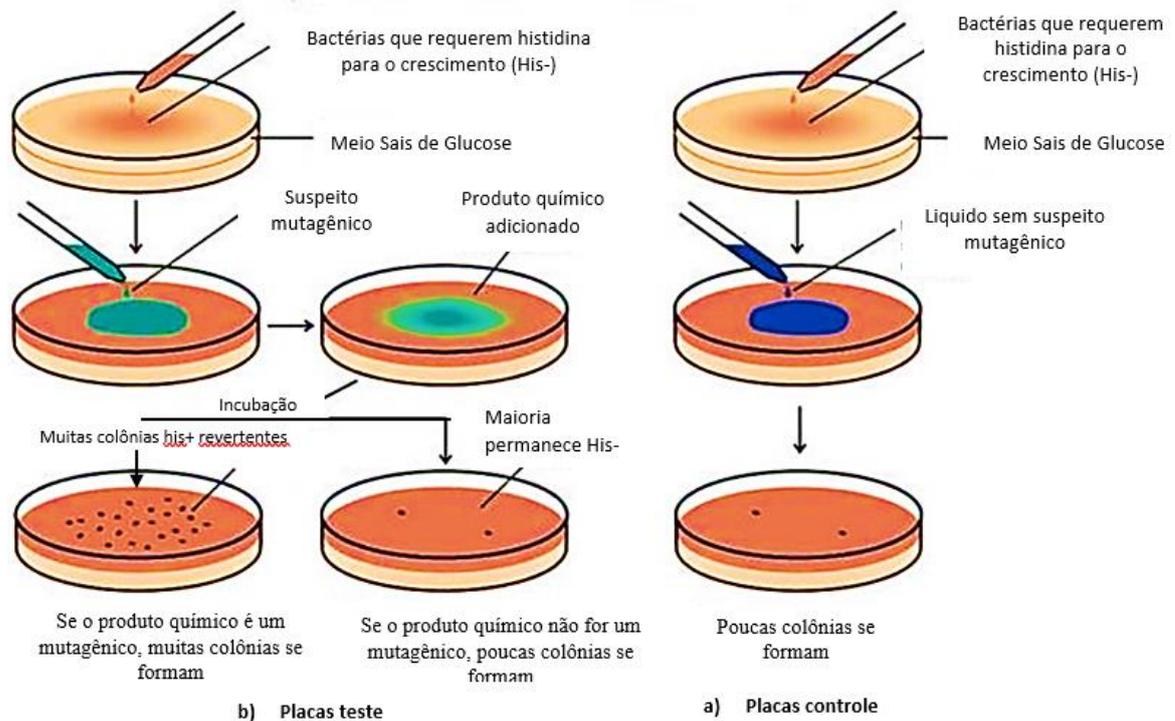


Figura 14: Teste de Ames em cepas de *Salmonella typhimurium*

Fonte: BORGES (2005 *apud* ALBERTS, 2004).

As alterações presentes nos aminoácidos Histidina foram desenvolvidas para detectar mutações, sejam do tipo deslocamento do quadro de leitura (*frameshift*) ou substituições de pares de bases no DNA (MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Os genótipos de cepas testadoras de *Salmonella* mais usados são: TA100, TA1535, TA98, TA1538, TA1537. As cepas TA1535 e TA1538 são precursoras das cepas isogênicas correspondentes TA100 e TA98 (AMES; MCCAN; YAMASAKI, 1975), devido a transferência de um fator denominado transferência de resistência (fator R) Pkm101, que nada mais é do que plasmídeos responsáveis por conferir resistência à Ampicilina.

O plasmídeo Pkm101 aumenta a mutagenese através de um aumento na via de reparo de DNA recombinacional propensa a erros (MARON & AMES, 1983). Além disso, as cepas possuem o gene *muc*, cuja expressão diminui a fidelidade do sistema de reparo (DNA Polimerase), facilitando a ocorrência de mutações espontânea e induzidas (MARON & AMES, 1983).

As cepas de *Salmonella typhimurium* TA1535 e TA100 possuem uma mutação denominada *hisG46*, que resulta da substituição de uma leucina (GAG/CTC) por uma prolina (GGG/CCC). Essa mutação pode ser revertida para o estado selvagem por um composto

mutagênico que cause uma substituição de pares de bases, em um dos pares de GC, facilitando, então, sua capacidade mutagênica (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

A mutação *hisD3052* é presente nas cepas TA1538 e TA98. Trata-se de uma mutação consequente de um *frameshift*, facilitando a detecção de compostos mutagênicos que afetam o quadro de leitura do DNA de uma sequência repetitiva próxima, como, –C–G–C–G–C–G–C–G– (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Os controles positivos específicos para cada linhagem de *S. typhimurium* são sempre incluídos nos ensaios de mutagenicidade e antimutagenicidade. A azida sódica é utilizada como controle positivo da cepa TA 100 e a 4-nitroquinolina (4NQO) é utilizada no controle e indução de mutações na cepa TA 98 (KAEZER, 2008).

O teste de Ames possui muitos benefícios, como, a simplicidade, um banco de dados validados, baixo custo e uma flexibilidade significativa com relação a possibilidade de utilizar diversos tipos de amostra e concentrações, ou seja, a capacidade de estabelecer uma relação dose-resposta (CLAXTON; UMBUZEIRO; DEMARINI, 2010). Além disso, a capacidade das linhagens de TA98 e TA100 em detectar cerca de 90% dos compostos mutagênicos conhecidos, dão o suporte necessário para a aplicação do teste nos laboratórios, bem como segurança para a identificação de produtos químicos ou amostras ambientais que sejam mutagênicas, o que nos mostra que teste não será substituído tão cedo (MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar as possíveis atividades angiogênicas, antiangiogênicas, mutagênicas e antimutagênicas da planta Quina-do-cerrado (*Strychnos pseudoquina*).

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a possível atividade angiogênica da Quina-do-cerrado (*Strychnos pseudoquina*) através da realização de testes laboratoriais “in vivo”, utilizando a membrana corioalantóide do ovo embrionado de galinha como modelo experimental.
- Investigar a possível atividade antiangiogênica da Quina-do-cerrado (*Strychnos pseudoquina*) através da realização de testes laboratoriais “in vivo”, utilizando a membrana corioalantóide do ovo embrionado de galinha como modelo experimental.
- Investigar o potencial mutagênico da Quina-do-cerrado (*Strychnos pseudoquina*) através da realização do teste de mutagenicidade de Ames com a cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*.
- Investigar o potencial antimutagênico da Quina-do-cerrado (*Strychnos pseudoquina*) através da realização do teste de mutagenicidade de Ames com a cepa TA100 de *Salmonella typhimurium*.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Planta *Strychnos pseudoquina*

O material foi adquirido no comércio Chá e Cia – Ervas Medicinais, localizado na Avenida das Linhas, nº123, Bairro Villa Branca, Cidade Jacareí – SP, CEP: 12301-150 CNPJ: 08.852.492/0001-55, Insc. Est: 392.232.981-118, Inscrição Municipal: 54956^a, origem do produto: Brasil, produzido e distribuído por: J T F Produtos Naturais, lote: 022021, validade: 04/2022.

Foi preparada uma solução aquosa das cascas da Quina-do-cerrado (*Strychnos pseudoquina*) de acordo com as orientações do fabricante para uso popular. A solução foi preparada no Laboratório de Estudos Experimentais Biotecnológicos da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO), em Goiânia, Goiás.

Foi utilizado 60g (gramas) da casca triturada para um litro de água, o que equivale a dose recomendada pelo fabricante, de duas colheres de sopa para 1 litro de água. Em seguida, foi levado em um recipiente ao fogo até levantar fervura. Ao desligar, o recipiente foi abafado por 10 minutos, logo, pronto para uso. Para a realização dos testes, foram utilizadas 3 (três) concentrações, sendo, 15mg/mL, 30mg/mL e 60 mg/mL.

4.2 Cepa bacteriana

Foi utilizada cepas bacterianas de *Salmonella typhimurium*: TA-100. As cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Radiobiologia e Mutagênese, da Universidade Federal de Goiás, Câmpus Samambaia, Goiânia-Goiás, Brasil.

4.3 Ovos embrionados de galinha

Foi utilizado 80 ovos férteis de galinha (*Gallus domesticus*) da linhagem Rhoss, adquiridos em feira popular Antônio Ferreira de Oliveira, conhecida como Feirão do Nova Aurora, localizada na Avenida Contorno – Vila Nova Aurora, CEP: 76380-000, na cidade de Goianésia, Goiás.

4.4 Materiais e insumos

4.4.1 Teste da Membrana corioalantoide

- a) Cloreto de Sódio 0,9% - 10 mL: Solução Injetável 9mg/mL, Farmace Indústria Químico – Farmacêutica Cearense LTDA, Lote: 20J110672D. Validade: outubro de 2022.
- b) Controle negativo: Água para Injeção – 10 mL. Equiplex Indústria Farmacêutica LTDA, Lote: 2032556, Validade: novembro de 2022.
- c) Controle inibidor: Fosfato dissódico de dexametasona injetável 4mg/ mL – Farmace Indústria Químico – Farmacêutica Cearense LTDA, Lote: DX19J169. Validade: outubro de 2021.
- d) Controle indutor: Gel-creme REGEDERM®. Composição: Soro *Hevea brasiliensis* (derivado do látex). Produzido pela empresa Pele Nova Biotecnologia S.A. Creme cicatrizante de feridas. CNPJ: 05.051.581/0001-09 (FERREIRA *et al*; 2009).
- e) Soluções Teste: solução aquosa das cascas da Quina-do-cerrado (*Strychnos pseudoquina*) diluídas em água mineral nas seguintes diluições: 15mg/L, 30mg/L, 60 mg/L, 90mg/L e 120mg/L.
- f) Formaldeído 37% - Rioquímica LTDA – Lote n. 0402296.

4.4.2 Teste de Ames

- a) Placa Master: Ágar Nutritivo (7g), água destilada (500 mL).
- b) Solução de sais de Vogel-Bonner: Sulfato de magnésio hidratado (1 g), ácido cítrico monohidratado P.A. (10 g), fosfato de potássio dibásico P. A. (50 g), fosfato de sódio e amônio P. A. (17,5 g), água morna destilada (65 mL).
- c) Solução de Dextrose 40%: Dextrose P. A. (120g), água destilada (180mL).

- d) Meio Mínimo Glicosado (placa-teste): Ágar (15g), solução de sais de Vogel-Bonner (20mL), solução de dextrose (50mL), água destilada (930mL).
- e) Soluções de Histidina: Histidina (50mg), água destilada (10mL).
- f) Solução de Biotina: Biotina (18mg), água destilada (125mL).
- g) Traços de histidina e biotina: Biotina (30,9mg), L-Histidina (24mg), água destilada (250mL).
- h) Ágar de superfície (top-ágar): Ágar Bacteriológico (0,6 g), cloreto de Sódio (NaCl) (0,5 g), água destilada (100mL).
- i) Caldo Nutritivo: Caldo Nutritivo (2,5g), água destilada (100 mL).
- j) Controle Positivo: TA98 – 4 nitroquinolina (4NQO) (0,005g), água destilada autoclavada (1mL).
TA100 – Azida sódica (0,005g), água destilada autoclavada (1mL).
- k) Controle Negativo: TA 98 e 100 – Água destilada autoclavada

4.5 Procedimento experimental

4.5.1 Angiogênese e antiangiogênese

A atividade angiogênica e antiangiogênica da solução aquosa da casca da Quina-do-cerrado (*Strychnos pseudoquina*) foi avaliada através da membrana corioalantóide (CAM) do ovo embrionado de galinha no Laboratório de Estudos Experimentais e Biotecnológicos (LEB), do Mestrado de Ciências Ambientais e Saúde (MCAS), da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO).

Os ovos de galinhas embrionados foram incubados em estufa automática a temperatura de 37°C – 38 °C, com umidade entre 60 e 70%, e deslocados lateralmente de forma automática a cada 15 minutos, durante os cinco primeiros dias da incubação.

No quinto dia, uma abertura circular de 1,0 cm de diâmetro foi realizada na base maior da casca de cada um dos ovos incubados, com o auxílio de uma micro retífica da marca

Dremel® (Figura 15). O processo de abertura dos ovos foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar, em ambiente previamente esterilizado com luz ultravioleta, amenizando o risco de contaminação.

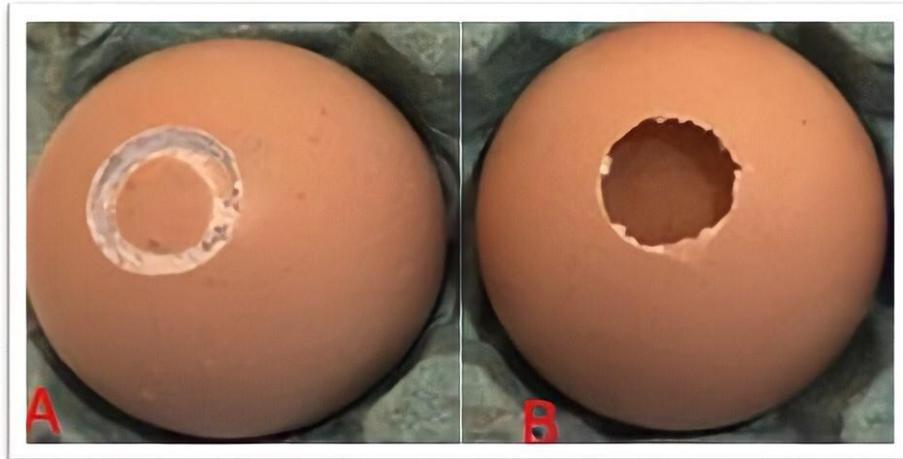


Figura 15: Abertura circular da casca do ovo com o auxílio de uma micro retífica. A- Procedimento da abertura circular na base maior do ovo com auxílio de micro retífica. Figura B- Exposição da membrana fosca da casca fosca após abertura.

Fonte: Acervo pessoal (2021).

Após a realização da abertura na casca dos ovos, foi depositada uma gota de cloreto de sódio (NaCl) 0,9% p/v estéril através de uma seringa com intuito de auxiliar na retirada da membrana da casca, expondo a CAM já vascularizada (Figura 16). A abertura foi vedada com fita adesiva (Figura 17) e o ovo novamente incubado sem agitação periódica.



Figura 16: Exposição da CAM vascularizada após a retirada da membrana da casca.

Fonte: Acervo pessoal (2021).



Figura 17: Ovos vedados com fita adesiva, prontos para incubação até o 13º dia.

Fonte: Acervo pessoal (2021).

Ao fim do 13º dia de incubação, discos de papel de filtro veiculando a solução de Quina-do-cerrado (*Strychnos pseudoquina*) a ser testada e os controles (negativo, indutor e inibidor), foram depositados diretamente sobre a membrana corioalantóide de forma cautelosa. Ao fim desta etapa, todos os ovos voltaram para a incubadora até o 16º dia.

No 16º dia, todos os ovos foram preenchidos até a abertura das cascas com solução de formol (3,7 % v/v) por 10 minutos (Figura 18), e em seguida, as CAMs foram cortadas detalhadamente, retiradas e mantidas em placa de Petri com a solução de formol para serem devidamente fotografadas.

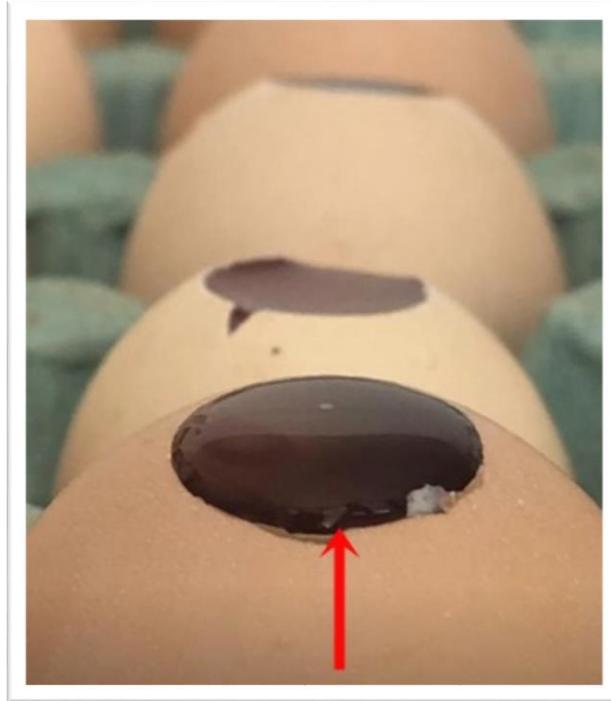


Figura 18: Ovos no 16º dia preenchidos com solução formol 3,7% até a abertura da casca.

Fonte: Acervo pessoal (2021).

Ao término do experimento, as MCAs foram fotografadas por meio de equipamento digital – Smartphone iPhone 8 Plus – Câmera Grande Angular – 28mm de 12 megapixels (MP), ISO 40, resolução de tela Full HD de 1920 x 1080 pixels, e fotos com resolução de 4608 x 2592 pixels sobre um fundo branco, com distância focal de 14cm, a fim de padronizar as imagens para análise e quantificar da rede vascular neoformada.

A imagem capturada foi analisada e a da rede vascular neoformada quantificada. A quantificação da rede vascular foi realizada por meio da determinação da área percentual de cada ensaio. Foram utilizados os programas PhotoScape, versão v3.7 para Windows, um software de edição de fotografia e o Image J (versão 1.28).

As imagens foram preparadas de forma padronizada pelo programa PhotoScape com relação a cor, tamanho do corte (205 x 205), saturação, brilho e contraste para obtenção da melhor resolução dos vasos sanguíneos.

4.5.2 Análise histológica

Para a Análise histológica, a MCA do ovo embrionado foi fixada em solução de formaldeído a 10% e, posteriormente, retiradas para serem desidratadas com álcoois em estufa a $\pm 65^{\circ}\text{C}$, em seguida, passaram pelo processo de diafanização, impregnação em parafina e incluídas em parafina para realização da microtomia.

Cada bloco de parafina foi seccionado em micrótomo Leica Microsystems Nussloch GmbH, D-69226 Nussloch (Germany), modelo RM 2125 a $5\mu\text{m}$ de espessura. Após realização do corte, a fita de parafina com a CAM foi colocada em banho maria a $\pm 45^{\circ}\text{C}$ e pescada com a lâmina. Em seguida, todas as lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina, através da técnica clássica, para visualização da vascularização em microscópio óptico.

Posteriormente, imagens microscópicas das lâminas histológicas foram obtidas através da câmera digital de alta definição para microscópio Leica ICC50 HD Câmera, número de série 50142125.

4.5.3 Mutagênese e antimutagênese

A cepa de *S. typhimurium* TA100 foi inoculada em caldo nutriente estéril e incubada por 12h a 37°C , sob agitação constante em banho-maria agitador, até atingirem a fase estacionária de crescimento. Na avaliação da atividade mutagênica, alíquotas de $100\mu\text{l}$ das culturas de cada cepa bacteriana foram incubadas com 10mg/placa, 5mg/placa, 2,5mg/placa, 1,25mg/placa e 0,62mg/placa da *S. pseudoquina* por 25 minutos à 37°C , em tubos de ensaio em triplicata com agitação constantes. Os controles negativos ($20\mu\text{L}$ de água destilada autoclavada) e positivos ($20\mu\text{l}$ de azida sódica para TA100) também foram incluídos nos experimentos. Na avaliação da atividade antimutagênica, os controles positivos foram coadministrados com as diferentes doses da *S. pseudoquina*. Após a incubação, foi adicionado ágar glicosado liquefeito (top-ágar) à temperatura de 45°C , contendo solução de histidina/biotina (0,5 Mm). O conteúdo foi homogeneizado em vórtex e em seguida vertido em placas de petri, em triplicata, contendo meio sólido (ágar mínimo glicosado), em seguida foram incubadas a 37°C durante 48 horas em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (D.B.O). Após este período, através de um contador eletrônico, foram contados os números de colônias revertentes prototróficas para histidina, considerando a média aritmética dos resultados entre as placas, apresentados pela

média do número de revertentes prototróficas por placas realizadas de forma independente e em triplicata (MARON & AMES, 1983; MORTELMANS & ZEIGER, 2000).

Todas as vidrarias utilizadas foram devidamente esterilizadas em estufa a 180°C, por 1 hora. As soluções e os meios de cultura utilizados no teste de Ames foram autoclavadas a 120°C, por 20 minutos, salvo exceções incluídas no procedimento operacional padrão (POP).

Ao fim do experimento, todo material descartado foi previamente autoclavado a 120°C, por 20 minutos. Após o descarte, as vidrarias eram higienizadas com detergente neutro, e logo após com solução de hipoclorito de sódio (1:1) por uma noite. Por fim, eram enxaguadas diversas vezes em água corrente.

4.6 Parâmetros de avaliação

4.6.1 Angiogênese e antiangiogênese

A análise das imagens foi realizada pelo programa Image J, capaz de separar intervalos de níveis de intensidade e desta forma isolar e quantificar os pixels correspondentes aos vasos sanguíneos. A quantidade de pixels selecionada é proporcional ao nível de vascularização do campo de imagem capturado, segundo metodologia utilizada por Melo-Reis *et al* (2010), Luay *et al* (2018) e Azzarello *et al* (2007). A porcentagem de área vascularizada por campo corresponde às áreas marcadas em vermelho nas imagens.

4.6.2 Mutagênese e antimutagênese

A avaliação do teste de mutagenicidade da *S. pseudoquina* após a contagem do número de colônias revertentes, foi calcular a razão de Mutagenicidade (RM) para todas as doses testadas. A equação empregada para calcular a RM, foi:

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

O teste é considerado positivo para a mutagenicidade, quando o número de colônias revertentes nas placas teste for igual ou superior ao dobro do número de colônias revertentes espontâneas do controle negativo (MARON & AMES, 1983).

O teste é considerado positivo para a antimutagenicidade, quando o número de colônias revertentes nas placas teste for igual ou superior ao dobro do número de colônias revertentes espontâneas do controle positivo (MARON & AMES, 1983). A porcentagem de inibição da mutagenicidade (PI) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$PI(\%) = \left[1 - \left(\frac{n. \text{ de revertentes na placa teste} - RE}{n. \text{ de revertentes na placa do controle positivo} - RE} \right) \right] \times 100$$

Onde:

- Placa teste: placas incubadas com mutágeno e composto. Número de Histidina positiva revertentes em placas de teste.
- Placa do controle positivo: placa incubada somente com o mutágeno.
- RE: revertentes espontâneos (cepas testes incubadas na ausência de composto e mutágeno).

4.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados obtidos na análise macroscópica para a quantificação da rede vascular neoformada da MCA e no teste de Ames, foi realizada utilizando o software BioEstat versão 5.3.

O Teste de Normalidade Shapiro-Wilk foi utilizado para definir o melhor método de análise estatística a ser aplicado, levando em consideração $p > 0,05$ amostras com distribuição normal. Em seguida, o teste de análise de variância (ANOVA) foi aplicado para determinar possíveis diferenças significativas entre as médias, e por fim, o teste post-hoc de Tukey, para demonstrar entre quais grupos havia diferenças significativas $p < 0,05$.

No teste de Ames, após a contagem do número de revertentes e calculada a razão de mutagenicidade (RM) para cada dose utilizada, e a porcentagem de inibição da mutagenicidade (PI), os seguintes parâmetros foram considerados:

1. Mutagenicidade: O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo quando comparado ao controle negativo.
2. Antimutagenicidade: O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo quando comparado ao controle positivo.

4.8 Aspectos éticos

A legislação brasileira não possui nenhuma menção a aspectos éticos obrigatórios relacionados aos ensaios com a CAM (OLIVEIRA, 2020). Portanto, o embrião de galinha é isento da necessidade de aprovação por comitês de ética para executar experimentos com a CAM. O que se tem, até o momento, é um consenso entre cientistas de que embriões com 80% de tempo de incubação (17 dias aproximadamente) devem ser sacrificados por métodos semelhantes aos de neonatos aviários, através de overdose anestésica, decapitação ou inalação de dióxido de carbono (CO₂) (KANCZLER *et al*; 2017).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade angiogênica e antiangiogênica da *S. pseudoquina* pelo teste da membrana corioalantóide – MCA

Os resultados obtidos através da porcentagem de área vascularizada na CAM foram realizados através da análise de 10 CAM's após o tratamento com a solução de *S. pseudoquina* em três concentrações, bem como os controles negativo, positivo e inibidor, que são apresentados na Tabela 1 e na figura 19 em forma de gráfico.

Tabela 1 – Porcentagem da vascularização da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha após tratamento com solução aquosa de *S. pseudoquina* e os controles

Nº CAM's	Controle Positivo	Controle Negativo	Controle inibidor	<i>S. pseudoquina</i> – 15mg/mL ^{b,c}	<i>S. pseudoquina</i> – 30 mg/mL ^{a,b,c}	<i>S. pseudoquina</i> – 60 mg/mL ^{a,b,c}
1	17,3	8,6	2,3	15,8	17,4	17,1
2	17,7	9,8	2,6	15,7	17,0	16,3
3	18,3	8,9	2,8	16,4	17,2	17,4
4	18,2	9,2	1,5	16,7	18,6	18,2
5	18,5	9,0	2,9	15,8	17,2	17,9
6	18,4	9,2	2,8	15,7	17,1	17,1
7	17,8	9,0	1,5	15,0	16,7	18,8
8	18,3	7,7	1,4	14,9	17,5	16,9
9	17,0	9,0	1,6	14,6	16,2	16,4
10	19,0	8,8	2,2	13,8	16,2	15,7
Média	18,1%	8,9%	2,2%	15,4%	17,1%	17,2%
DP*	0,60	0,53	0,61	0,87	0,69	0,94

ANOVA, Tukey

^a p>0,05 quando comparado ao controle positivo;

^b p<0,05 quando comparado ao controle negativo;

^c p<0,05 quando comparado ao controle inibidor.

* DP = Desvio Padrão

Através do teste *pos-hoc* de Tukey, foi possível analisar diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos controles Regederm (Positivo), Dexametasona (Inibidor) e a água (Negativo).

Os três grupos testes de *S. pseudoquina* quando comparados aos controles negativos e inibidor apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), demonstrando seu potencial angiogênico.

Os grupos testes de solução de *S. pseudoquina* nas concentrações de 30mg/mL e 60mg/mL apresentaram uma média de 17,1% e 17,2% respectivamente, e o controle positivo uma média de 18,1%, não demonstrando diferença significativa ($p > 0,05$). Esse achado demonstra uma atividade angiogênica significativa nos testes com a solução da casca de *S. pseudoquina*.

Na análise estatística dos grupos teste, somente uma concentração, a menor, de 15mg/mL da casca da *S. pseudoquina* (15,4%), que não demonstrou semelhança estatística significativa ($p < 0,05$) quando comparada ao controle positivo Regederm (18,1%), ou seja, a mesma apresenta um potencial angiogênico só que inferior ao controle positivo quando comparadas.

Na figura 19, podemos analisar claramente as diferenças entre as membranas dos grupos teste e controles de acordo com a porcentagem de suas áreas vascularizadas de forma ilustrada.

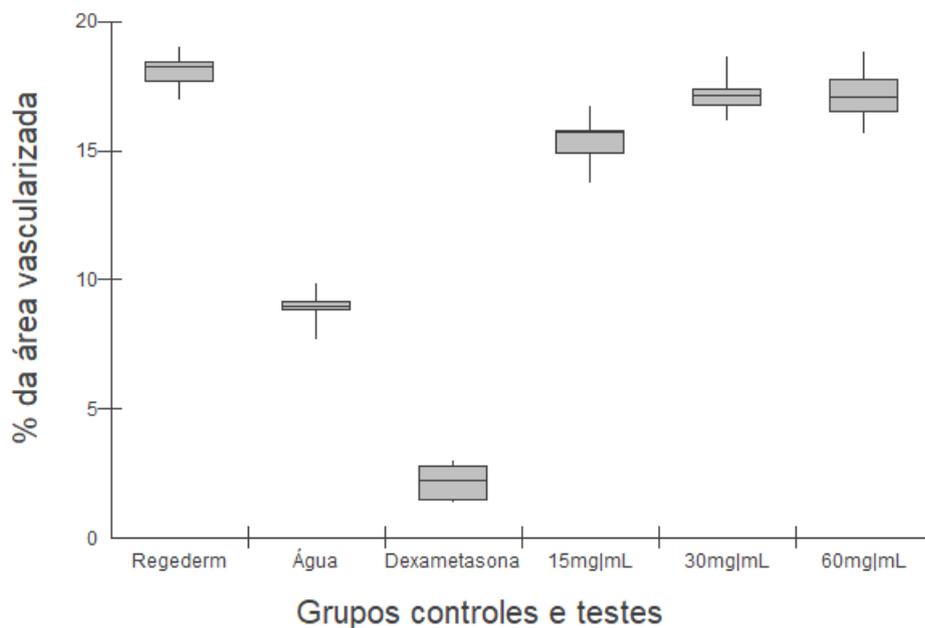


Figura 19: Gráfico Box-Plot da porcentagem da área vascularizada da membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha após tratamento com solução aquosa de *S. pseudoquina* e os controles.

As análises realizadas no software image J proporcionou a visualização das redes capilares neoformadas com coloração vermelha, como demonstrado na figura a seguir (Figura 20).

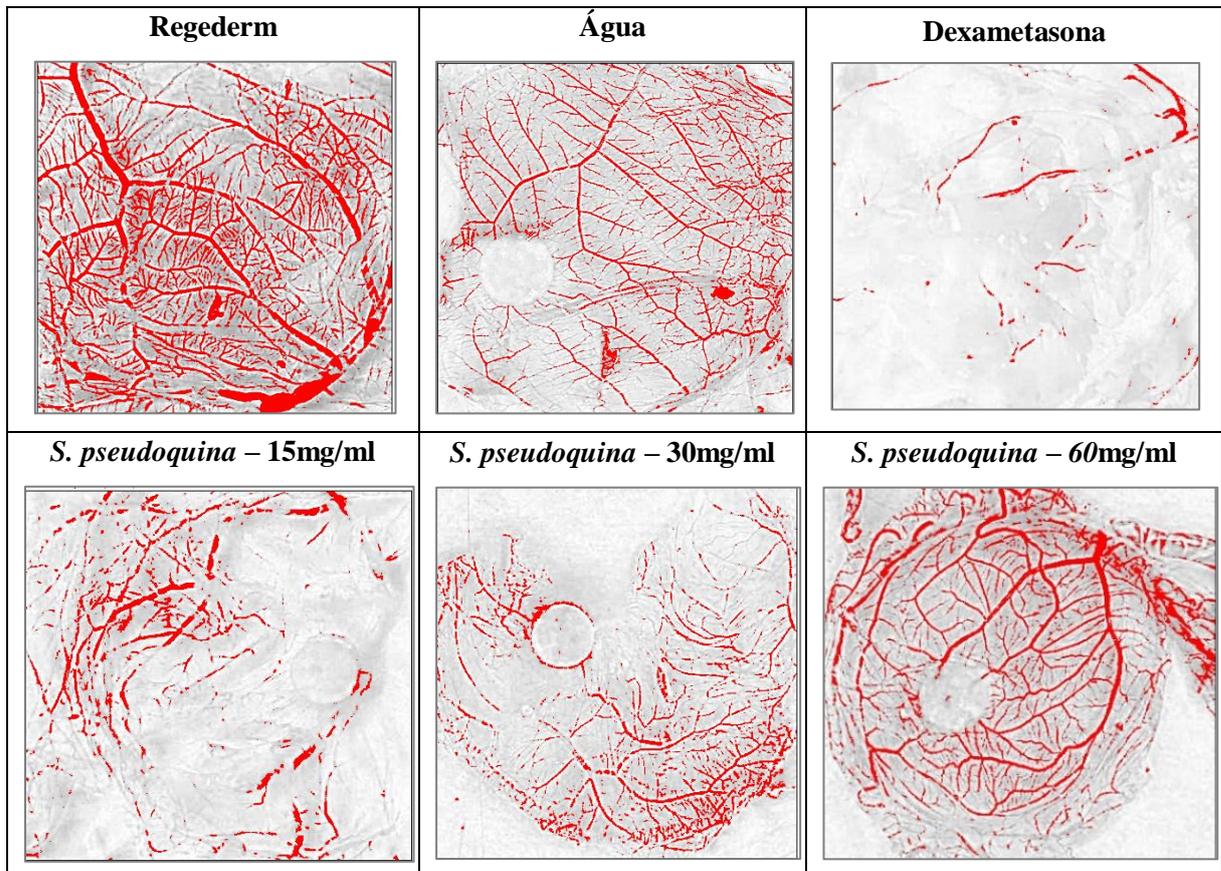
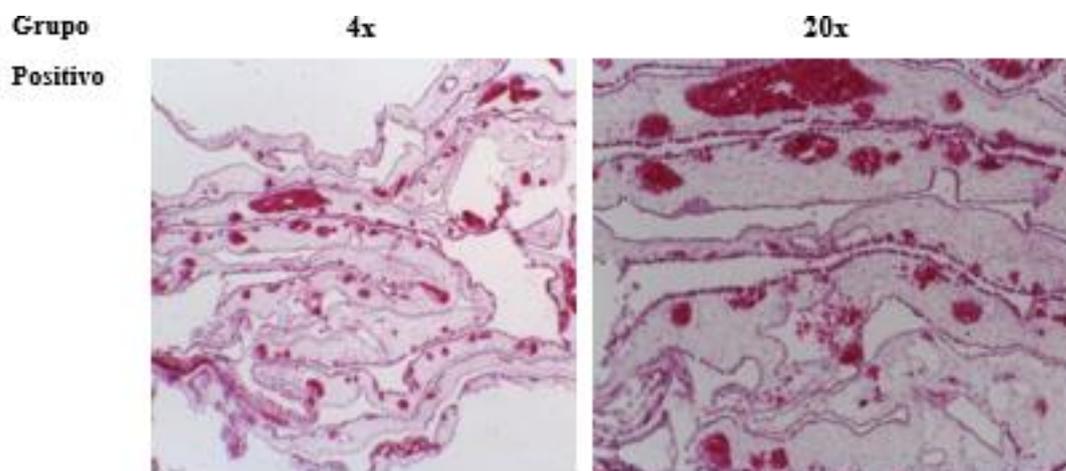


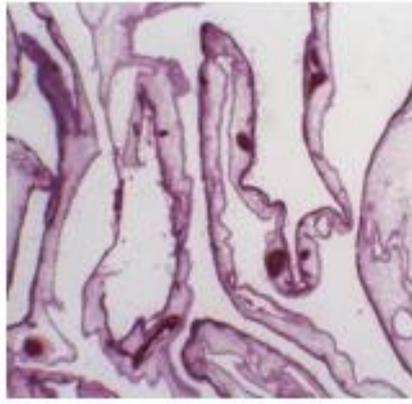
Figura 20: Análise de imagens da rede vascular neoformada em membrana corioalantóide (MCA) de ovos após tratamento com respectivos controles e testes, através do software imageJ

Fonte: Acervo pessoal (2021).

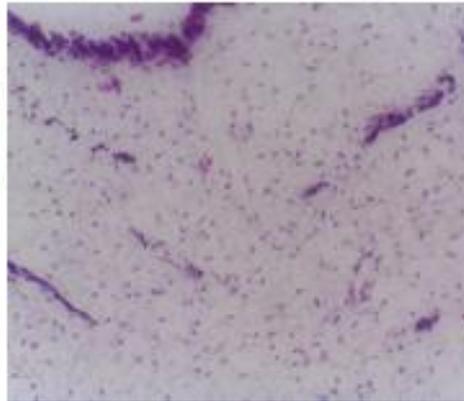
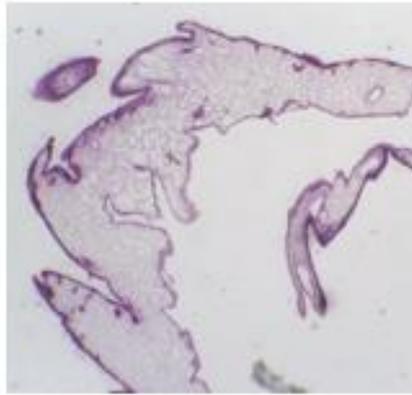
5.2 Análise histológica



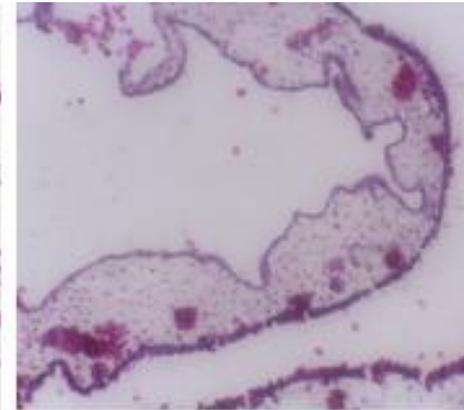
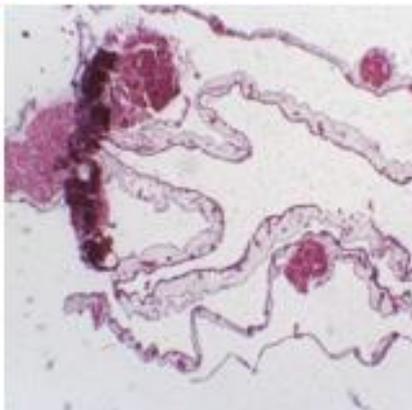
Negativo



Inibidor



15mg/mL



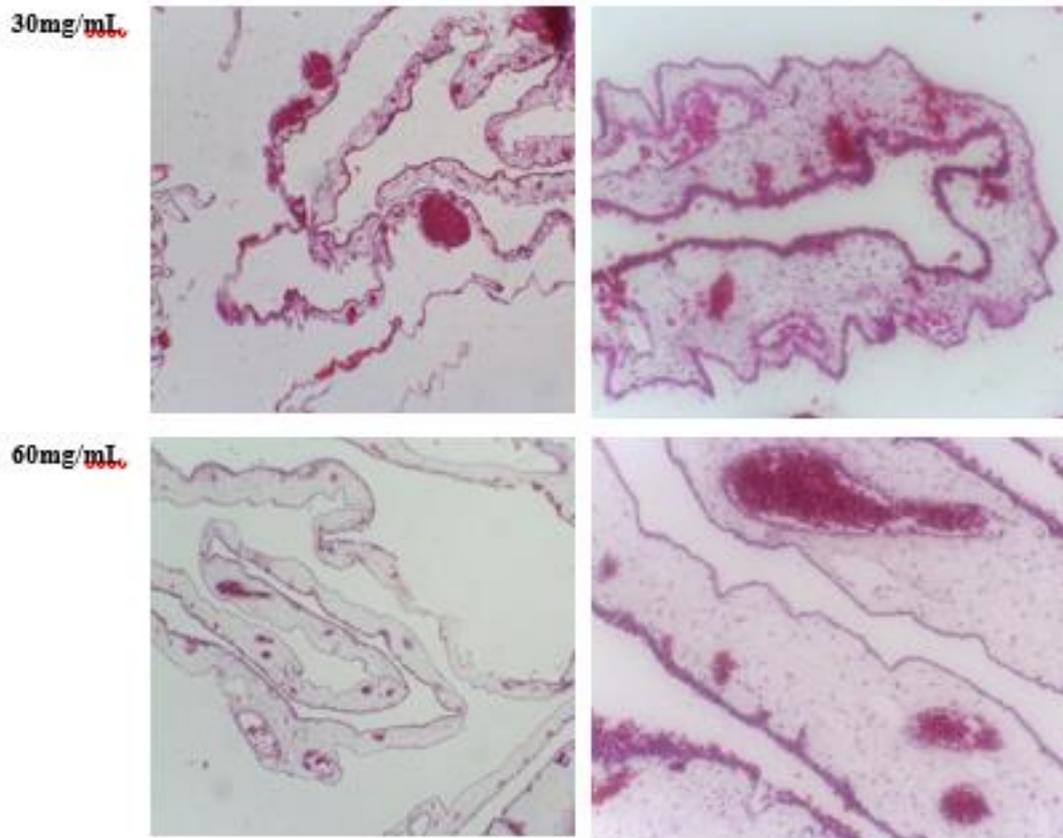


Figura 21: Fotomicrografia das lâminas histológicas da rede vascular neoformada em membranas corioalantóide (MCA) de ovos após tratamento com respectivos controles e testes.

Fonte: Acervo pessoal

Podemos observar que o Controle inibidor (dexametasona) apresentou poucas células do tecido conjuntivo e poucos vasos sanguíneos. O Controle negativo (Água) apresenta poucas quantidades de vasos sanguíneos quando comparado ao controle positivo (Regederm), o qual possui grande quantidade de vasos sanguíneos neoformados.

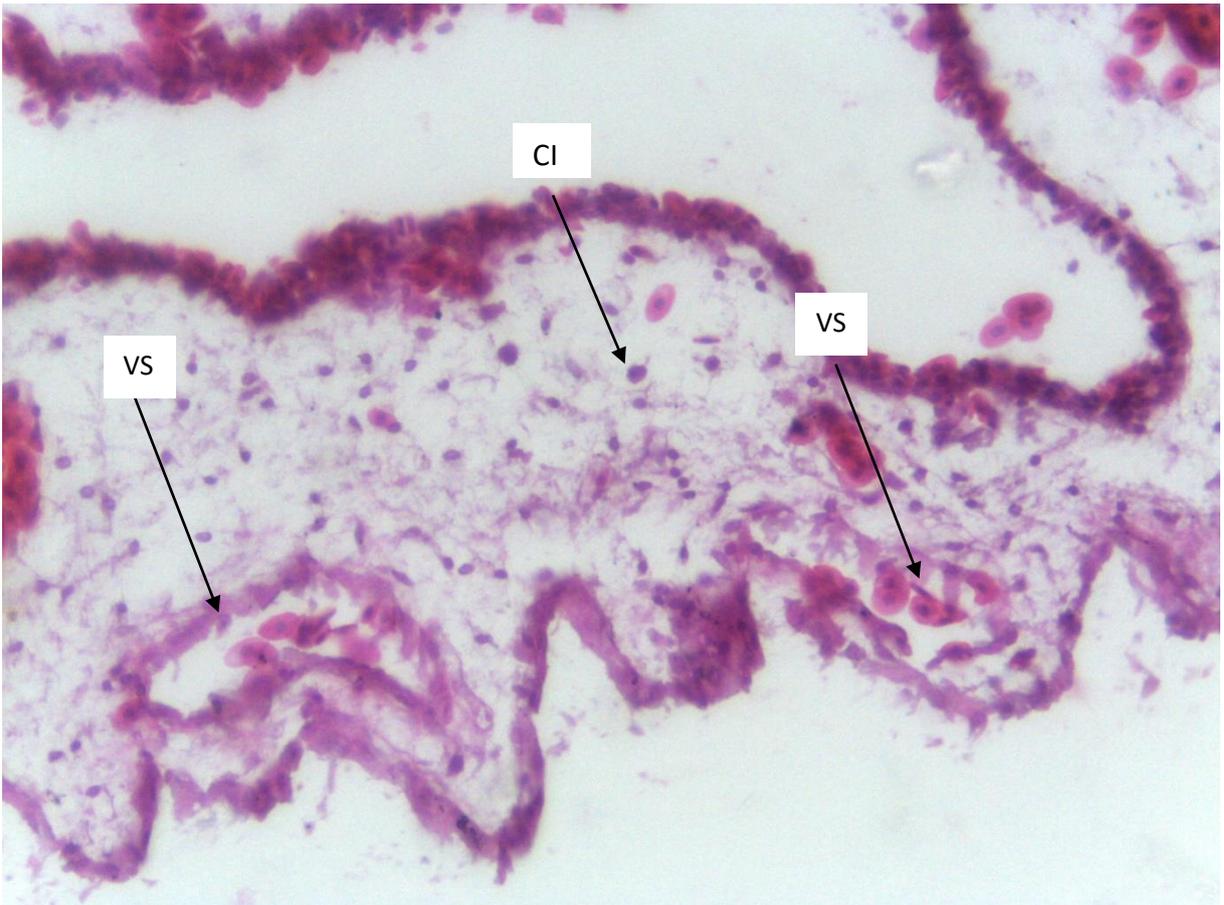


Figura 22. Fotomicrografia do corte histológico da MCA tratada com a solução de 30mg/mL de *Strychnos pseudoquina*. VS-vaso sanguíneo; CI-célula inflamatória.

Fonte: Acervo pessoal

Observamos a presença de tecido conjuntivo, elementos inflamatórios e vasos sanguíneos formados que exibem na luz vascular eritrócitos.

5.3 Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *S. pseudoquina*

Na tabela 2 estão apresentados os resultados da avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da *S. pseudoquina* pelo teste de Ames. Os resultados foram obtidos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Tabela 2. Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica do extrato aquoso de *S. pseudoquina* em *Salmonella typhimurium* pelo teste de Ames.

Tratamento	TA100		
Mutagenicidade	Média ± DP	RM (%)	PI (%)
Controle Negativo	322 ± 24	1.00	-
Controle Positivo	2961 ± 535*	9.19	-
<i>S. pseudoquina</i> 10 mg/placa	367 ± 44	1.14	-
<i>S. pseudoquina</i> 5 mg/placa	339 ± 77	1.05	-
<i>S. pseudoquina</i> 2.5 mg/placa	360 ± 60	1.12	-
<i>S. pseudoquina</i> 1.25 mg/placa	356 ± 41	1.11	-
<i>S. pseudoquina</i> 0.62 mg/placa	560 ± 68	1.74	-
Antimutagenicidade			
Controle Negativo	344 ± 21 [§]	-	-
Controle Positivo	1867 ± 135	-	0.00
<i>S. pseudoquina</i> 10 mg/placa + CP	2268 ± 351	-	0.00
<i>S. pseudoquina</i> 5 mg/placa + CP	2308 ± 524	-	0.00
<i>S. pseudoquina</i> 2.5 mg/placa + CP	2242 ± 557	-	0.00
<i>S. pseudoquina</i> 1.25 mg/placa + CP	2302 ± 197	-	0.00
<i>S. pseudoquina</i> 0.62 mg/placa + CP	1867 ± 135	-	0.00

ANOVA; Tukey.

Controle negativo: 20 µl de água destilada; controle positivo (CP): 20 µg/placa de azida sódica. Média ± desvio padrão (DP) das colônias revertentes. RM: Razão de mutagenicidade; PI: porcentagem de inibição.

*Diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle negativo.

§Diferença significativa (p<0,05) em relação ao controle positivo.

Na avaliação da atividade mutagênica, as diferentes concentrações de *S. pseudoquina* não apresentou diferença significativa (p>0,05) em relação ao controle negativo, em nenhuma das doses avaliadas neste estudo. Indicando que a solução aquosa de *S. pseudoquina* não apresenta potencial mutagênico nas diferentes doses testadas (10; 5; 2,5; 1,25; 0,62 mg/placa) neste estudo. Na avaliação antimutagênica, a *S. pseudoquina* não promoveu redução significativa (p>0,05) do número de colônias de *S. typhimurium*, quando comparado ao controle positivo (azida sódica 20 µg/placa) em nenhuma das doses testadas. Indicando que a solução aquosa de casca da *S. pseudoquina* não apresenta capacidade de proteção ao DNA bacteriano.

6 DISCUSSÃO

6.1 Avaliação da atividade angiogênica e antiangiogênica da *S. pseudoquina* pelo teste da membrana corioalantóide – MCA

Os dados obtidos pelos controles negativos (água – 8,9%) e inibidor (dexametasona – 2,2%) quando comparados ao controle positivo, apresentou uma quantidade de vasos sanguíneos baixa, como esperado, pelo fato de não haver estimuladores angiogênicos (Fatores de crescimento) no caso do controle negativo (água), ou pela presença de agentes inibidores, como a Dexametasona (HORI *et al*; 1996).

Nosso estudo, através dos testes realizados em modelo experimental de membranas corioalantóides de ovos embrionados (*in vivo*), demonstrou a capacidade da solução da casca da planta *S. pseudoquina* nas concentrações de 15, 30 e 60 mg/mL, de induzirem a formação de novos vasos sanguíneos nas MCAs, quando comparadas ao controle negativo e inibidor ($p < 0,05$).

O potencial angiogênico das concentrações de 30 e 60 mg/mL, quando comparadas ao controle positivo Regederm® não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Tais resultados nos mostram quão semelhante e relevante foi o potencial angiogênico dessas concentrações quando comparado ao Regederm®, um medicamento com eficácia cicatrizante e potencial angiogênico cientificamente comprovados (ZIMMERMANN *et al*; 2018; MENDONÇA, 2004).

Diversos componentes fitoquímicos da espécie *S. pseudoquina* foram identificados, como, os polifenóis, proantocianidinas, em maior quantidade nos extratos da casca do caule (GONTIJO, 2018), e os flavonoides isorhamnetina e estricnobilflavona, comuns nas folhas. (NICOLETTI *et al*; 1984; LAGE *et al*; 2013). Esses compostos estão diretamente associados com o processo de cicatrização (SANTOS *et al*; 2021), que didaticamente se divide em três fases: inflamatória, proliferativa, onde tem-se o processo de angiogênese, e por fim, a fase de remodelamento (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO; 2009). Tais achados justificam o processo de angiogênese demonstrado e comprovado neste estudo.

Um estudo realizado por Sarandy *et al*. (2018), demonstrou que a utilização da pomada à base de *S. pseudoquina* acelerou a cicatrização de feridas provocadas por segunda intenção no

dorso-lateral pela excisão da pele de ratos Wistar, devido as concentrações de constituintes fenólicos, flavonoides e alcaloides presentes na substância. O que explica seu alto poder cicatrizante, além de mostrar-se mais eficiente que a Sulfadiazina de prata no tratamento.

Outro fator interessante no estudo de Sarandy *et al.* (2018), e que corroboram com os nossos achados, é que os mastócitos, encontrados em maior número nas feridas tratadas com a *S. pseudoquina*, é um dos principais fatores relacionados no processo de cicatrização, devido sua capacidade de liberar fatores que estimulam a angiogênese, como, heparina, histamina, triptase, citocinas, como fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-8 (IL-8), fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (MENDONÇA; COUTINHO-NETTO; 2009; NG, 2010). Fatores esses que estão relacionados diretamente com a angiogênese (RIBATTI *et al.*; 2003; RIBATTI *et al.*; 2001; SOUZA, 2020). Além do número de mastócitos, as fibras colágenas e elásticas nas feridas de ratos foram maiores nos tratamentos com a planta, indicando uma potencialização da eficácia na cicatrização da ferida (Sarandy *et al.*; 2018).

Sarandy *et al.* (2017), avaliou o efeito da aplicação tópica de pomada à base de extrato hidroetanólico de cascas do caule de *Strychnos pseudoquina* nas concentrações de 5% e 10% na cicatrização de feridas cutâneas de ratos diabéticos. Além do potencial antioxidante, a planta apresentou uma alta taxa de cicatrização das feridas e maior quantidade de células (mastócitos, fibroblastos e macrófagos), colágeno tipo III e I, e vasos sanguíneos, assim como em nossos estudos para determinação da angiogênese.

Outro estudo realizado em 2011, por Bonamin *et al.* Utilizou extrato metanólico (ME) e da fração alcaloide enriquecida (EAF) das folhas de *Strychnos pseudoquina* para avaliar a ação cicatrizante no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético em ratos. Bem como nesta pesquisa, dados, onde observou que o número de vasos na mucosa gástrica de ratos tratados com EAF de *Strychnos pseudoquina* teve um aumento expressivo (4 vezes mais do que o tratamento controle), ou seja, o tratamento com EAF induziu ação cicatrizante na mucosa gástrica pela proliferação de vasos na mucosa, que estimularam a proliferação celular na região de cicatrização, além da presença da SOD (superóxido dismutase), um potente antioxidante, que possui a capacidade de eliminar o radicais livres, acelerar a cicatrização das lesões gástricas e aumentar a angiogênese.

Muitas são as plantas do cerrado que apresentam atividade angiogênica como a *Strychnos pseudoquina*, como: o Ipê Roxo (*Tabebuia impetiginosa*) (MORAES, 2015), látex de Aveloz

(*Euphorbia Tirucalli*) (BESSA, 2010), látex de Tiborna (*Himatanthus obovatus*) (SOUZA, 2017), açafão (*Curcuma longa*) (ARAÚJO, 2013), barbatimão (*Stryphnodendron adstringens*) (CHAVES, 2015) e a cola nota (*Synadenium umbellatum*) (MELO-REIS, 2010).

Diante dos dados apresentados neste trabalho, podemos afirmar a capacidade angiogênica da *Strychnos pseudoquina*. Uma planta com aplicações clínicas amplamente promissoras, principalmente devido seu potencial cicatricial.

6.2 Teste de mutagenicidade e antimutagenicidade da *S. pseudoquina* com *Salmonella typhimurium* -Teste de Ames

A *S. pseudoquina* não apresentou atividade mutagênica em cepas de *Salmonella typhimurium* nas concentrações testadas (10; 5; 2,5; 1,25; 0,62 mg/placa).

Corroborando com os dados obtidos neste estudo, Nunes (2008) testou o extrato etanólico da casca no teste de mutagenicidade de Ames, utilizando as cepas TA98 e TA100, o qual não demonstrou atividade mutagênica nas doses testadas. Em contrapartida, Gontijo, *et al* (2018) avaliaram a mutagenicidade de folhas e cascas da *S. pseudoquina* para mutagenicidade pelo teste de Ames, e constataram que ambos apresentaram potencial mutagênico, mas não prejudiciais ao DNA, visto que, segundo os autores, o extrato da casca do caule apresenta efeito citotóxico em *Salmonella typhimurium*, o que pode ter mascarado o efeito mutagênico neste modelo experimental.

A *S. pseudoquina* não apresentou atividade antimutagênica em cepas de *Salmonella typhimurium* nas concentrações testadas (10; 5; 2,5; 1,25; 0,62 mg/placa). No entanto, a investigação de Gontijo *et al* (2018), encontrou a presença de polifenóis, flavonoides e proantocianidinas em cascas e folhas de *S. pseudoquina*. Sabemos que tais substâncias possuem propriedades benéficas para saúde humana, atuando contra doenças e protegendo a estabilidade do genoma, como, antioxidantes e antimutagênicas (Gontijo *et al.* 2017).

Podemos observar que a literatura apresenta diversos resultados e pesquisas com concentrações e métodos diferentes para a avaliação do extrato desta espécie. Esses dados nos aponta a importância de estudos mais aprofundados, a fim de um consenso, para que a utilização de preparações caseiras desta planta possa ser segura. O desconhecimento de doses exatas, e de seus potenciais malefícios oferecem riscos à saúde.

7 CONCLUSÃO

- ✓ A solução aquosa da *S. pseudoquina* apresentou atividade angiogênica nas concentrações de 15mg/mL, 30mg/mL e 60mg/mL na membrana corioalantóide (MCA).
- ✓ A solução aquosa da *S. pseudoquina* não apresentou ação mutagênica nas concentrações testadas com a cepa *Salmonella typhimurium* TA100.
- ✓ A solução aquosa da *S. pseudoquina* não apresentou atividade antimutagênica nas concentrações testadas com a cepa *Salmonella typhimurium* TA100.

7.1 Perspectivas futuras

Este estudo apontou a possibilidade para o desenvolvimento de novas drogas através da utilização da planta medicinal *S. pseudoquina*, para o tratamento de lesões teciduais com o estímulo da cicatrização e recuperação de tecidos isquêmicos.

O desenvolvimento de estudos mais aprofundados, utilizando outros métodos de pesquisa com o objetivo de elucidar concentrações ideais para utilização da *S. pseudoquina* por diferentes vias de administração, o desenvolvimento de estudos sobre outras aplicabilidades do chá ainda não investigados e elucidados.

O investimento em estudos sobre as plantas medicinais, principalmente do Cerrado, deve ser considerado, uma vez que a utilização de plantas para o tratamento de patologias é comum e acessível, acima de tudo. O que facilita a disseminação de informações e conhecimento por parte dos profissionais da saúde para a população, para que consigam ter acesso a tratamentos com eficácia e segurança comprovada.

8 REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA, S. P. *et al.* Cerrado – espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA – CPAC. p 343-346, 1998.
2. AMES, B. N; MCCANN, J; YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res. Dec*; 31(6):347-64, 1975.
3. ARAÚJO, R. G. M. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DA CURCUMA LONGA. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, GOIÂNIA, 2013.
4. ASAHARA, T. *et al.* Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circulation Research*, 85(3), 221–228, 1999.
5. AZZARELLO, J; IHNAT, M. A; KROPP, B. P; WARNKE, L. A; LIN, H. K. Assessment of angiogenic properties of biomaterials using the chicken embryo chorioallantoic membrane assay. *Biomedical materials (Bristol, England)*, 2(2), 55–61, 2007.
6. BACKLUND, M; OXELMAN, B; BREMER, B. Phylogenetic relationships within the Gentianales based on ndhF and rbcL sequences, with reference to the Loganiaceae. *American Journal of Botany* 87(7): 1029–1043, 2000.
7. Bauer, S. M. Angiogenesis, Vasculogenesis, and Induction of Healing in Chronic Wounds. *Vascular and Endovascular Surgery*, 39(4), 293–306, 2005.
8. BESSA, G. O. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANGIOGÊNICA E DO POTENCIAL DE CICATRIZAÇÃO DO LÁTEX DE EUPHORBIA TIRUCALLI (AVELOZ). Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, GOIÂNIA, 2010.
9. BHADADA, S. V; GOYAL, B. R.; PATEL, M. M. Angiogenic targets for potential disorders. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 25(1), 29–47, 2011
10. BOFF, L; SILVA, I. T; ARGENTA, D. F. *et al.* Strychnos pseudoquina A. St. Hil.: a Brazilian medicinal plant with promising in vitro antiherpes activity. *Journal of Applied Microbiology*, 121(6), 1519-1529, 2016.

11. BONAMIN, F. *et al.* Can a *Strychnos* species be used as antiulcer agent? Ulcer healing action from alkaloid fraction of *Strychnos pseudoquina* St. Hil. (Loganiaceae). *J Ethnopharmacol.* 31;138(1):47-52, 2011.
12. BORGES, F. F. V. Atividades antimutagênica, antigenotóxica e anticitotóxica de *Silybum marianum* (L.) Gaertn e sua influência na expressão de genes de resposta a danos no DNA. Tese (Doutorado em Biologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2015.
13. BRANDÃO, E. K. S; RAPINI, A. Flora da Bahia: Loganiaceae. *Sitientibus série Ciências Biológicas.* 18: 10, 2018.
14. BRAT, D. J; VAN MEIR, E. G. “Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research.” *The American journal of pathology* vol. 158,3: 789-96, 2001.
15. BUCKER, N. C. F. EFEITO ANTITUMORAL E ANTIANGIOGÊNICO DE EXTRATOS BRUTO E SUPERCRÍTICO DE *BIDENS PILOSA* LINNÉ E *CASEARIA SYLVESTRIS* SWARTZ. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, 2012.
16. BURCHAM, P. C. Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat Res.* Jul 15;443(1-2):11-36, 1999.
17. CARMELIET, P. Mecanismos de angiogênese e arteriogênese. *Nat Med.* 6 :389-395, 2000.
18. CHAVES, D. A. INFLUÊNCIA DO BARBATIMÃO (*Stryphnodendron adstringens*) NA ANGIOGÊNESE E GENOTOXICIDADE. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, GOIÂNIA, 2015
19. CLAXTON, L. D; UMBUZEIRO, G. A; DEMARINI, D. M. O ensaio de mutagenicidade de *Salmonella*: o estetoscópio da toxicologia genética para o século XXI. *Perspectiva de Saúde Ambiental.*118(11):1515-1522, 2010.
20. COSENZA, G. P. QUINAS AMARGAS BRASILEIRAS: HISTÓRICO, PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADE ANTIHIPERGLICÊMICA E ANTIHIPERLIPIDÊMICA. Belo Horizonte. Tese de Doutorado: Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia, Programa de PósGraduação em Ciência de Alimentos. 2015
21. COSTA, R. A. Estudo químico e biológico de *Strychnos amazonica*. 2014. 145 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.
22. COUFFINHAL, T. *et al.* *Les mécanismes de l'angiogenèse. Applications médicales et thérapeutiques.* 22(11), 0–1082, 2001.

23. DA SILVA, M. A; RAFACHO, B. P; HIRUMA-LIMA, C. A; DA ROCHA, L. R; DOS SANTOS, L. C., SANNOMIYA, M; SOUSA-BRITO, A. R; VILEGAS, W. Evaluation of *Strychnos pseudoquina* ST. HIL. Leaves extract on gastrointestinal activity in mice. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 53, n. 8, p. 881-885, 2005.
24. DE SAINT-HILAIRE, A. *Plantes usuelles des brasieliens*. Paris. *Plantas usuais dos Brasileiros*. Código, Dataplant. Belo Horizonte, 2009.
25. DOROTHY, M. M; BRUCE, N. Ames. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutagenesis*, 113(3-4), 173–215, 1983.
26. DUCKE, A. O gênero *Strychnos* L. no Brasil. *Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte*, Pará 30: 5-64. 1955.
27. FERREIRA, M *et al.* Angiogenic properties of natural rubber latex biomembranes and the serum fraction of *Hevea brasiliensis*. *Brazilian Journal of Physics*, 39(3): 564-9, 2009.
28. FLAMBÓ, D. F. A. L. P. *Atividades biológicas dos Flavonoides: atividade antimicrobiana*. Dissertação de mestrado. 2013
29. FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. Nov 18;285(21):1182-6, 1971.
30. FOLKMAN, J; SHING, Y. Angiogenesis. *J Biol Chem*. Jun 5;267(16):10931-4. 1992.
31. FONSECA, M.C.M. *Epamig pesquisa, produção de Plantas Mediciniais para Aplicação no SUS*. Espaço para o produtor, Viçosa, 2012.
32. FRANCO, D. M; ALDO, P; TUCCI, G. B; BETTOLO, M. The occurrence of nordihydrotoxiferine in *strychnos pseudoquina* a. *St. Hil.* 10(25), 2009–2010, 1969.
33. GARAMBONE, E; ROSA, G; POSSÍVEIS BENEFÍCIOS DO ÁCIDO CLOROGÊNICO À SAÚDE. *Alim. Nutr.*, Araraquara v.18, n.2, p. 229-235, 2007.
34. GONCHAROVA, R. I. Antimutagenез kak geneticheskii protsess [Antimutagenesis as a genetic process]. *Vestn Ross Akad Med Nauk.*; (1):26-33. Russian. 1993.
35. GONTIJO, D. C; *et al.* Identification of phenolics compounds and biologically related activities from *Ocotea odorifera* aqueous extract leaves. *Food Chemistry*, 230, 618–626, 2017.
36. GONTIJO, D. C; *et al.* Assessment of the phenolic content, mutagenicity and genotoxicity of ethanolic extracts of stem bark and leaves from *Strychnos pseudoquina* A. *St.-hil. Drug Chem Toxicol. Sep*;43(5):539-545, 2020.
37. GOODWIN, A.M. Ensaio de angiogênese in vitro para avaliação de agentes angiogênicos e antiangiogênicos. *Microvasc Res* . 74(2-3):172-183, 2007.

38. GUIMARÃES, E. F.; MANOEL, E. A.; SIQUEIRA, C. E.; ZAPPI, D. Loganiaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Rodriguésia 68(4): 1357-1375. 2015.
39. HARAGUCHI, H.; ISHIKAWA, H.; MIZUTANI, K.; TAMURA, Y.; KINOSHITA, T. Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 6, p. 339-347, 1998.
40. HASSLER, M. Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World (Version 2021-03-17). 2021
41. HILAIRE, A. Plantes usuelles des brasiiliens. Paris: Grimbert Libraire, 1828. MOURÃO, C. P. B., SANTIAGO, C. F. (tradução) Plantas usuais dos brasileiros. Belo Horizonte: Código Comunicação, P. 11- 16, 2009.
42. HONÓRIO-FRANÇA, A. C. *et al.* Evaluation of hypoglycemic activity and healing of extract from amongst bark of “Quina do Cerrado” (*Strychnos pseudoquina* ST. HILL). *Acta Cirúrgica Brasileira* [online]. v. 23, n. 6, pp. 504-510, 2008.
43. HORI, Y. *et al.* Efeitos diferenciais de esteróides angiostáticos e dexametasona na angiogênese e nos níveis de citocinas em implantes de esponja de rato. *Br J Pharmacol.* 118(7):1584-1591, 1996
44. HOULT, J.R; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol.* Jun;27(4):713-22. 1996
45. JURADO, J; ALEJANDRE-DURAN, E; ALONSO-MORAGA, A; PUEYO, C. Study on the mutagenic activity of 13 bioflavonoids with the Salmonella Ara test. *Mutagenesis.* 1991 Jul;6(4):289-95, 1991.
46. KALEBIC, T; GARBISA, S; GLASER, B; LIOTTA, L. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. *Science*, 221(4607), 281–283, 1983.
47. KERBEL, R; FOLMAN, J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors., 2(10), 727–739, 2002.
48. Klagsbrun, M., & Moses, M. A. Molecular angiogenesis. *Chemistry & Biology*, 6(8), p217–R224, 1999
49. KONTOS, C. D; ANNEX, B. H. Angiogenesis. *Curr Atheroscler Rep* 1, 165–171,
50. KRUKOFF, B.A; BARNEBY, R.C. Supplementary notes on the American species of *Strychnos*. VIII. *Memoirs of New York Botanical Garden* 20(1): 1-93. 1969.
51. KURZ, H.; BURRI, P. H.; DJONOV, V. G. *Angiogenesis and Vascular Remodeling by Intussusception: From Form to Function.* *Physiology*, 18(2), 65–70, 2003.

52. LAGE, P. S. Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from *Strychnos pseudoquina* 66oné66l66 *Leishmania infantum*. *Parasitology research*, 114(12), 4625–4635. 2015
53. LAGE, P. S. *et al.* “*Strychnos pseudoquina* e seus compostos purificados apresentam uma atividade antileishmania in vitro eficaz”, *Medicina alternativa e complementar baseada em evidências*, vol. 2013, 2013.
54. LORIER, G; TOURIÑO, C; KALIL, R A. Angiogênese coronariana como resposta endógena da isquemia miocárdica no adulto. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia [online].*, v. 97, n. 6, pp. E140-e148, 2011.
55. LU, K; BHAT, M; BASU, S. Plantas e seus compostos ativos: moléculas naturais para direcionar a angiogênese. *Angiogênese*. 19(3):287-295, 2016.
56. LUAY, M. A. M; GONZAGA, M. F. R; PO, S. K D; AROLLADO, E. C. Determination of the Antiangiogenic Activity of *Telescopium telescopium* (Horn snail) Extract using in ovo Chorioallantoic Membrane (CAM) Assay. *ACTA MÉDICA PHILIPPINA VOL. 52 N. 4*, 2018
57. MANOEL, E. A; GUIMARÃES, E. F. O gênero *Strychnos* (LOGANIACEAE) no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia* 60 (4): 865-877. 2009
58. MARCINKIEWICZ, C. Angiogenesis Agents. *Current Pharmaceutical Design*, 13(35), 3543–3544, 2007.
59. MARON, D. M., AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113: 173-215, 1983.
60. MELO-REIS, P. R; ANDRADE, L. S; SILVA, C. B; ARAÚJO, L. M. M; PEREIRA, M. S; MRUE, F; CHEN-CHEN, L. Angiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax latex. *Brazilian Journal of Biology*. Vol. 70, no. 1, p. 189-194. 2010.
61. MENDONÇA, R, J; COUTINHO-NETTO, J. Aspectos celulares da cicatrização. *Anais Brasileiros de Dermatologia [online].*, v. 84, n. 3, pp. 257-262, 2009.
62. MENDONÇA, R. J. de. Caracterização biológica de uma fração angiogênica do látex natural da seringueira *Hevea brasiliensis*. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.
63. MORAES, P. S. P de. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA, MUTAGÊNICA E ANTIMUTAGÊNICA DA SOLUÇÃO AQUOSA DA *Tabebuia impetiginosa* (Ipê roxo). Dissertação (Mestrado em Ciências Humanas) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, GOIÂNIA, 2015.

64. MOREIRA, R. R. D. *et al.* Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonoídicos 7-metoxilados relacionados. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 12, n. 1, pp. 11-19, 2002.
65. MORS, W. B; DO NASCIMENTO, M. C, PEREIRA, B.M.R; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite - the molecular approach. *Phytochemistry*. 55(6):627–642, 2000
66. MORTELMANS, K; ZEIGER, E *The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay*. , 455(1-2), 29–60, 1999.
67. MORTELMANS, K; ZEIGER, E. The Ames Salmonella/ microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, 455, 29-60, 2000.
68. NG, M. F. The role of mast cells in wound healing. *International Wound Journal*, 7: 55-61, 2010.
69. NICOLETTI, M, *et al.* Flavonoids and alkaloids from *Strychnos pseudoquina*. *J Nat Prod*. Nov-Dec;47(6):953-7, 1984.
70. NIJVELDT, R.J *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*. Oct;74(4):418-25. 2001
71. NUNES, L. G. *Phytochemistry prospection and mutagenicity evaluate in vitro of tree species vegetable: Strychnos pseudoquina A. St.-Hil., Coutarea hexandra (Jacq.) K. Schum and Bathysa cuspidata (A.St.-Hil.) Hook. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia molecular de plantas; Bioquímica e Biologia molecular animal) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.*
72. NURIT, K; AGRA, M. F; BASÍLIO, I. J. L. D; BARACHO, G.S, 2005 Baracho: Flora da Paraíba, Brasil: Loganiaceae. *Acta bot. Bras.* 19(2): 407-416. 2005.
73. OLIVEIRA, L. B. O, *et al.* ANGIOGÊNESE E TUMORIGÊNESE: ONDE OCORRE A INTERSECÇÃO E AS POSSIBILIDADES DE TERAPIAS. VITTALLE, Rio Grande, 22(2): 11-22, 2010.
74. PAPETTI, M. *et al.* Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American*
75. PAPETTI, M.; HERMAN, I. M. *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. AJP: Cell Physiology*, 282(5), C947–C970, 2002.
76. PETER, H. Burri; Ruslan Hlushchuk; Valentin Djonov. Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. 231(3), 474–488, 2004.
77. PHILIPPE, G; ANGENOT, L; TITS, M; FREDERICH, M. PHILIPPE *et al.* About the toxicity of some *Strychnos* species and their alkaloids. *Toxicon* 44: 405–416. 2004

78. PINHO, M. S. L. Angiogênese: o gatilho proliferativo. *Rev. Bras. Colo-Proctol.*, v.24, n. 4, p. 396-406, 2017.
79. RÉGIS, T. S, *et al.* Avaliação da atividade mutagênica e antimutagênica da Aloe vera em teste de Allium cepa e teste de micronúcleo em linfócitos humanos binucleados. *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.* 20(3), 2010.
80. RIBATTI, D. *et al.* Chorioallantoic membrane capillary bed: a useful target for studying angiogenesis and anti-angiogenesis in vivo. *Anat Rec. Dec 1;264(4):317-24*, 2001.
81. RIBATTI, D. *et al.* The role of mast cells in tumour angiogenesis. *Br J Haematol. Dec;115(3):514-21*, 2001.
82. RIBATTI, D. *et al.* Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *Eur J Clin Invest. May;33(5):420-5*, 2003.
83. RIBEIRO, J. N. *et al.* Avaliação dos parâmetros sanguíneos de hepatotoxicidade em coelhos normais submetidos a tratamentos com antocianina e antocianina + naringenina. Ribeiro, Joselito Nardy; Nagem, Tanus Jorge; Oliveira, Tania Toledo; Ferreira Junior, Davilson Bragine; Pinto, Aloisio da Silva. *ev. bras. Anal. Clin; 38(1): 23-27*, 2006.
84. RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F; MARQUES, E. K. *Mutagênese Ambiental*. Editora da ULBRA, Canoas, RS. 355p, 2003.
85. RISAU, W. Mecanismos de angiogênese. *Natureza*, 386: 671-674, 1997.
86. RISAU, W; FLAMME, I. *Vasculogenesis. Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11(1), 73–91, 1995.
87. SANTOS, F. V; COLUS, I. M. S; SILVA, M. A; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. 44(9), 0–1589, 2006.
88. SANTOS, W. W. dos.; ALMEIDA, P. M. de ; ALVES, W. S. .; BACELAR, L. L. .; MAIA FILHO, A. L. M. .; OLIVEIRA, M. das D. A. de .; FERREIRA, D. C. L. .; SANTOS FILHO, F. S. .; MARTINS, F. A. . The healing effect of the 68oné68l extract of the leaves of *Himatanthus obovatus* (Müll Arg.) Woodson. *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 8, p. e29010817461, 2021.
89. SARANDY, M. M, *et al.* Hydroethanolic Extract of *Strychnos pseudoquina* Accelerates Skin Wound Healing by Modulating the Oxidative Status and Microstructural Reorganization of Scar Tissue in Experimental Type I Diabetes. *BioMed research international*, 2017.

90. SARANDY, M. M, *et al.* *Strychnos pseudoquina* modula a reorganização morfológica do tecido cicatricial de feridas cutâneas de segunda intenção em ratos. *PloS ONE* 13 (4): e0195786, 2018.
91. SARANDY, M. M; *et al.* “Hydroethanolic Extract of *Strychnos pseudoquina* Accelerates Skin Wound Healing by Modulating the Oxidative Status and Microstructural Reorganization of Scar Tissue in Experimental Type I Diabetes”, *BioMed Research International*, vol. 2017, Article ID 9538351, 11 pages, 2017.
92. SHILKIN, E. S.; *et al.* Translesion DNA Synthesis and Carcinogenesis. *Biochemistry (Moscow)*, 85(4), 425–435, 2020.
93. SILVA, M. A. *et al.* Evaluation of *Strychnos pseudoquina* ST. HIL. Leaves Extract on Gastrointestinal Activity in Mice. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 53(8), 881–885, 2005.
94. SILVA, M. R. da. Análise da distribuição de alcaloides piridínicos em diferentes fases fenológicas de *Senna multijuga* (Rich) Irwin et Barn. Tese (Doutorado), São Paulo, 2011
95. SOUSA, M. A. M de. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANGIOGÊNICA/ANTIANGIOGÊNICA E MUTAGÊNICA/ANTIMUTAGÊNICA DO LÁTEX DO *Himatanthus obovatus* (TIBORNA). Dissertação (Programa de Pós-Graduação STRICTO SENSU em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia – GO, 2017.
96. SOUZA, F. R. Relação mastócitos e angiogênese em neoplasias mamárias caninas. 2020. 49 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2020.
97. STEVENS, P. F. (2001 onwards). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July, 2017.
98. TEPPER, O. M, *et al.* Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Feb* 1;105(3):1068-77, 2005.
99. TOMANEK, R. J, SCHATTEMAN, G. C. Angiogenesis: new insights and therapeutic potential. *Anat Rec.* Jun 15;261(3):126-35, 2000.
100. VEIGA, J. *et al.* Plantas medicinais: cura segura?. *Química Nova* [online]. v. 28, n. 3, pp. 519-528. 2005
101. VEIGA, J. V. F. da. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 308–313. 2008

102. WITAICENIS, A, *et al.* Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives. *Phytomedicine*. Feb 15;21(3):240-6. 2014
103. YOO, S. Y., & KWON, S. M. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators of inflammation*, 2013.
104. YOSHIDA, W; B. Angiogenesis, arteriogenesis and vasculogenesis: treatment of the future for lower limb critical ischemia?. *Jornal Vascular Brasileiro*, v. 4, n. 4, p. 316-318, 2005.
105. ZAPPI, D. C. Flora de Grão-Mongol, Minas Gerais: Loganiaceae. *Bol. Bot. Univ. São Paulo* 22(2):273-276. 2004
106. ZAPPI, D. *et al.* Neotropikey – Interactive key and information resources for flowering plants of the Neotropics. 2009.
107. ZAPPI, D. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil – Loganiaceae. *Rodriguésia*. V. 57, n.2, p. 193-204. 2006
108. ZEIGER, E. The Test that Changed the World: The Ames Test and the Regulation of Chemicals. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2019.
109. ZIMMERMANN, M. *et al.* Membrana de látex natural de *Hevea brasiliensis* auxilia no processo de reparação tecidual em bovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia [online]*. v. 70, n. 03, 2018.

9. ANEXOS

9.1 Protocolo do experimento de angiogênese e antiangiogênese

PROTOCOLO ANGIOGÊNESE

DIA 1°	<p>Os ovos embrionados de galinha:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. assepsia e antissepsia dos ovos 2. em seguida: incubados em estufa automática a temperatura de 37°C-38°C. 3. umidade entre 60 e 70%. 4. deslocados lateralmente a cada 15 minutos, durante os cinco primeiros dias de incubação.
DIA 5°	<p>Ovos retirados da estufa:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Abertura circular na casca (1,0 cm de diâmetro) em sua base maior (onde está localizada a câmara de ar) (Micro Retífica Dremel®). 2. Após abertura da casca dos ovos: gota de cloreto de sódio a 0,9% (NaCl 0,9%), para a facilitação da retirada da membrana interna do ovo, expondo a Membrana Corioalantóide (MCA) já vascularizada. A abertura vedada com fita adesiva. 3. Ovo foi novamente incubado a 37°C-38°C. 4. sem agitação periódica 5. Todo procedimento realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar, em ambiente previamente esterilizado com luz ultravioleta.
DIA 13°	<ol style="list-style-type: none"> 1. discos de papel de filtro 0,5 cm de diâmetro, veiculando: 2. Embebidos da solução a ser testada (<i>Strchinos pseudoquina</i>). 3. Embebidos de água destilada (controle negativo) 4. Embebidos de solução injetável de dexametasona 4mg/ml (controle inibidor) 5. Embebidos de Regederm® (controle positivo). 6. Para cada teste: substâncias depositadas diretamente sobre a membrana corioalantóide de forma cuidadosa. 7. incubação
DIA 16°	<ol style="list-style-type: none"> 1. Solução de formol (3,7%) até a abertura na casca do ovo por 15 minutos. MCAs: cortadas e retiradas mantidas em placa de Petri com solução de formol. 2. Após isso, imagens padronizadas da MCAs sobre fundo branco. 3. Análise e quantificação da rede vascular pelo programa Image J.

9.2 Técnica de processamento histológico da MCA

1. PROCEDIMENTO TÉCNICO

1.1. Coleta

Após a coleta do material biológico, realizar a fixação com formol 10% (item 2.2).

Observação em relação ao armazenamento da peça anatômica inteira: para o armazenamento das peças inteiras recomenda-se cortar ao meio os órgãos de capsulas espessa – coração, rins, baço e fígado (pedaço) exceto encéfalo – para colocar no formol 10% até o momento de colocar no cassete. Quando for colocar as amostras no cassete cortar um pedaço dos órgãos e em seguida realizar a desidratação (item 2.3).

Se no mesmo dia da coleta for realizar a desidratação seguir o procedimento a partir da fixação (item 2.2).

1.2. Fixação

Após a coleta do material realizar um corte no órgão reduzindo-o em um fragmento tecidual, para que seja colocado no cassete (com tampa de fechar). Depois identificar as amostras e realizar a etapa de fixação, colocando os cassetes imersos em formol a 10% por 2 horas.

1.3. Desidratação

Em seguida retirar o material do formol e realizar a desidratação em temperatura ambiente (T.A) ou na estufa (est. $\pm 65^{\circ}\text{C}$).

1. Colocar em álcool a 50% por 1 hora (T.A) ou 30 minutos (est. 65°C).
2. Colocar em álcool a 70% por 1 hora (T.A) ou 30 minutos (est. 65°C).
3. Colocar em álcool a 85% por 1 hora (T.A) ou 30 minutos (est. 65°C).
4. Colocar em álcool absoluto por 1 hora (T.A) ou 30 minutos (est. 65°C).
5. Colocar em álcool absoluto por 1 hora (T.A) ou 30 minutos (est. 65°C).
6. Colocar em álcool absoluto por 1 hora (T.A) ou 30 minutos (est. 65°C).

1.4. Diafanização

7. Colocar o material em Xilol (3 trocas de 15 minutos cada (T.A) ou 1 hora (est. $\pm 65^{\circ}\text{C}$)).

Obs: Ao despejar o xilol no recipiente com as amostras, ele não deve apresentar coloração turva. Caso isto aconteça retirar o xilol e repetir uma vez a amostra em álcool absoluto e depois voltar para o xilol continuando assim o procedimento.

1.5. Impregnação na parafina

8. Em seguida retirar o xilol e colocar os cassetes em parafina líquida ($\pm 65^{\circ}\text{C}$) por 2 horas na estufa a $\pm 65^{\circ}\text{C}$ (no máximo 70°C).

Obs: Escorrer bem o material antes de colocar na parafina. Olhar a temperatura da estufa e da parafina antes de colocar o material.

A temperatura da parafina e do processo de desidratação é fundamental para que não ocorram danos ao tecido. Não podemos assim, passar de 70°C .

1.6. Processo de inclusão (fazer o bloco), microtomia (cortar o bloco, espessura $5\mu\text{m}$), e coloração HE (Hematoxilina e Eosina)

Enquanto o material passa às 2 horas na estufa (item 8) colocar parafina a parte em um recipiente para derreter e também colocar as formas para aquecer dentro da estufa.

Passadas as 2 horas, em uma bancada realizar o processo de inclusão das peças, sendo assim, para que o material não esfrie retirar os cassetes, a parafina e as formas da estufa à medida que for realizando a inclusão das peças nas formas.

Retirar a forma da estufa e preencher todo o espaço com parafina quente e em seguida colocar o material a ser analisado e o cassete por cima da parafina na forma de metal e deixar esfriar.

Quando a parafina endurecer, levar para um recipiente com gelo. Por 10 a 20 minutos (para a parafina soltar da forma). Levar o bloco de parafina que está o material para o micrótopo (o qual vai cortar o bloco em pequena fita de $55\mu\text{m}$). Retirar a fita de parafina com o material do equipamento e jogar em banho maria ($+45^{\circ}\text{C}$), realizar a pesca da fita com a lâmina.

Identificar cada lâmina e em seguida colocar na estufa a 65°C , por mais ou menos 35 minutos. Depois disto realizar o procedimento de coloração do material.

Obs: pode-se utilizar lamparina com álcool para auxiliar na inclusão.

1.7. Coloração:

Coloração HE

Passos	Soluções	Tempos ou Mergulhos
1	Xilol	5 minutos
2	Álcool absoluto	10 mergulhos
3	Álcool absoluto	10 mergulhos
4	Álcool absoluto	10 mergulhos
5	Água corrente	3 mergulhos
6	Hematoxilina	8 minutos
7	Água corrente	3 mergulhos
8	HCL á 5%	1 a 2 mergulhos rápidos
9	Água corrente	3 minutos
10	Eosina	3 minutos
11	Álcool absoluto	10 mergulhos
12	Álcool absoluto	10 mergulhos
13	Álcool absoluto	10 mergulhos
14	Xilol	20 mergulhos
15	Xilol	20 mergulhos

- Depois da coloração, secar e limpar as lâminas retirando o excesso de interferentes.
- Colocar algumas gotas de cola (específica para procedimentos histológicos como por ex: verniz) na lamínula e montar a lâmina.
- Obs: Antes de montar a lâmina se necessário limpar a lamínula com xilol retirando todo o pó de vidro.
- Após montar as lâminas deixar secar a temperatura ambiente.
- Analisar em microscópio óptico (40x).

2. PREPARO DOS REAGENTES

Diluições:

- Álcool a 50%: 200ml de água + 200ml de álcool absoluto = Vf: 400ml
- Álcool a 70%: 120ml de água + 380ml de álcool absoluto= Vf:400ml
- Álcool a 85%: 60ml de água + 340 ml de álcool absoluto= vf:400ml
- Formol a 10%: 900ml de água+ 100ml de formol= Vf: 1000ml ou 1 L

9.3 Protocolo do experimento de mutagênese e antimutagênese

Solução de sais de Vogel-Bonner

Sulfato de magnésio P.A.....	1g
Ácido Cítrico monohidratado P.A.....	10g
Fosfato de potássio dibásico P.A.....	50g
Fosfato de sódio e amônio P.A.....	17,5g
Água destilada.....	65mL

Os ingredientes devem ser adicionados em um frasco com capacidade igual ou superior á 200mL. Posteriormente, devem ser feitas alíquotas de 20mL em frascos âmbar. As alíquotas devem ser autoclavadas por 20 minutos á 120°C. Logo, após esfriar, estas devem ser armazenadas em temperatura ambiente ao abrigo da luz.

Solução de Dextrose 40%

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

Meio Mínimo Glicosado (placa-teste)

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

Adicionar o ágar na água, em frasco de 2 L. Autoclavar à 120°C por 20 minutos. Deixar esfriar até aproximadamente 60°C. Adicionar 20ml da solução de sais e 50ml de solução de glicose e agitar vigorosamente. Dispensar volumes de 25 a 30ml em placas de petri esterilizadas.

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

Solução de histidina

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

Solução de biotina

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

Placa Máster

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

Solução de histidina/biotina 0,5 mM

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

Ferver a água e adicionar histidina e biotina. Agitar até dissolução, autoclavar por 20 minutos à 120°C. estocar na geladeira em frascos de vidro.

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

Ágar Bacto	3g
Cloreto de Sódio (NaCl)	2,5 g
Água destilada	500 mL

Adicionar NaCl em frasco de vidro e o ágar com 500ml de água destilada. Aquecer para dissolver o ágar por 10 minutos. Autoclavar por 20 minutos à 120°C e guardar em temperatura ambiente.

Caldo Nutriente

Caldo Nutritivo	2,5g
Água destilada	100 mL

Adicionar o caldo na água e agitar até dissolver. Fazer alíquotas de 20ml em 5 garrafas de vidros, que deverão ser autoclavadas por 20 minutos à 120°C.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL OPERACIONAL PADRÃO – TESTE DE AMES

- Limpar os aparelhos com álcool 70%;
- Preparar o TOP – ÁGAR;
- Adicionar ao TOP-ÁGAR 20 mL de traços de histidina-Biotina;
- Distribuir 2 mL do TOP-ÁGAR em cada um dos tubos e levá-los ao banho seco. É necessário 1 tubo de TOP-ÁGAR para cada tratamento e controles.
- Adicionar a cada tubo 20 µL de solução controle e 100 µL da cepa *S. typhimurium* e levá-los ao shaker por 25 min à 37° C;
- Após esse período, adicionar o TOP-ÁGAR em cada um dos tubos incubados com abateria e vertê-los na placa teste;
- As placas deverão ser incubadas na B.O.D por 48 h à 37°C

PLACA MÁSTER

- Em um Erlenmeyer, acrescentar 7 g de ágar nutritivo e 500 mL de água destilada;
- Autoclavar a solução por 20 min à 120°C
- Após ser autoclavado, deixar ficar morno e acrescentar 25 mL de dextrose 40%, 10 mL de solução de sais de Vogel-Bonner, 5 mL de histidina e 3 mL de biotina;
- Em seguida, plaquear com o auxílio de uma proveta, 25 mL em cada placa;
- Após a solidificação, colocar as placas nas estufas por 14 h à 37°C;

PLACA TESTE

- Em um Erlenmeyer, adicionar 15 g de ágar e 930 mL e água destilada;
- Autoclavar a solução por 20 min à 120°C;
- Após autoclavada, deixar a solução esfriar (até aproximadamente 60°C) e adicionar 20 mL da solução de sais de Vogel-Bonner e 50 mL da solução de Dextrose, previamente aquecida a 60° C;
- Em placas de petri, previamente esterilizadas, dispensar volumes de 25-30 mL, com auxílio de uma proveta;

- Incubá-las na estufa à 37°C, antes do experimento por uma noite.