



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

**INVESTIGAÇÃO DA *Indigofera suffruticosa* SOBRE ATIVIDADE
ANTITUMORAL E ASPECTOS HISTOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DO
TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE SARCOMA**

180

IZABELA RANGEL LIMA

RECIFE, PE- BRASIL

2012

IZABELA RANGEL LIMA

**INVESTIGAÇÃO DA *Indigofera suffruticosa* SOBRE ATIVIDADE
ANTITUMORAL E ASPECTOS HISTOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DO
TECIDO HEPÁTICO DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE SARCOMA**

180

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Inovação Terapêutica do Centro de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção
do Título de Mestre em Inovação Terapêutica.**

**Orientadora: Prof^a Dra. Maria Bernadete de Sousa
Maia - Depto de Fisiologia e Farmacologia/CCB/UFPE**

**Co-Orientadora: Prof^a Dra. Sônia Pereira Leite - Depto.
de Histologia e Embriologia/CCB/UFPE**

RECIFE, PE- BRASIL

2012

Lima, Izabela Rangel

Investigação da *Indigofera suffruticosa* sobre atividade antitumoral e aspectos histológicos e morfométricos do tecido hepático de camundongos portadores de sarcoma 180/ Izabela Rangel Lima– Recife: O Autor, 2012.

58 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Bernadete de Sousa Maia

Coorientadora: Sônia Pereira Leite

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Inovação Terapêutica, 2012.

Inclui bibliografia

1. Fabaceae 2. Histologia 3. Fígado I. Maia, Maria Bernadete de Sousa II. Leite, Sônia Pereira III. Título

FOLHA DE APROVAÇÃO

IZABELA RANGEL LIMA

**INVESTIGAÇÃO DA *Indigofera suffruticosa* SOBRE ATIVIDADE ANTITUMORAL
E ASPECTOS HISTOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DO TECIDO HEPÁTICO
DE CAMUNDONGOS PORTADORES DE SARCOMA 180**

Dissertação apresentado ao Programa de
Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
da Universidade Federal de Pernambuco
como requisito para obtenção do título
de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Teresinha Gonçalves da Silva
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Roberta Maria Pereira Leite
Faculdade Maurício de Nassau

Aprovado em: ____/____/____

Dedico esta dissertação

*À minha mãe
pelo amor*

*Ao meu noivo Mardonny
pelo companherismo e alegria
que me proporciona*

*À orientadora Sônia pela
oportunidade, compreensão
e imenso carinho.*

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pela vida e por estar sempre me fortalecendo a cada dia.

À minha mãe e minha avó por todo amor e pela grande contribuição na minha formação pessoal e acadêmica.

Ao meu noivo Mardonny pelo amor e companheirismo de todos os momentos.
Te amo!!!

À Marli e Mirella pelo carinho.

À “minha segunda mãe” Prof. Dr^a Sônia Leite que me recebeu em seu laboratório no início da graduação e desde então vem me orientando não só academicamente mas pra vida. E pelos nossos momentos inesquecíveis de descontração. Obrigada por tudo professora!!!

À minha orientadora Prof. Dr^a Bernadete Maia pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr^o Haroudo Xavier pela imensa contribuição para realização do trabalho científico.

Ao Prof. Dr^o e colega Jeymesson Vieira pela amizade, carinho e inúmeras risadas proporcionadas.

Às Profs Dr^{as} Roberta Leite e Teresinha Gonçalves pelas sugestões pertinentes a dissertação.

À técnica de laboratório Fátima pelo auxílio na elaboração das lâminas e a todos os funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia pelos momentos de descontração e conversas ao longo desses anos.

Aos estagiários Ivanise e Antônio pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e momentos de descontração no laboratório.

Ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica pela oportunidade de realizar este trabalho.

A CAPES e a UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO pelo auxílio financeiro à dissertação.

**“A glória da amizade não é a mão estendida,
nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da compahia.
É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que
alguém confia em você”**

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

Indigofera suffruticosa Mill (Fabaceae) ocorre em abundância no nordeste brasileiro e tem intenso uso popular no tratamento de infecções, inflamações e outros processos. Os estudos farmacológicos do extrato aquoso de folhas têm demonstrado atividades biológicas tais como: antiinflamatória, embriotóxica, antimicrobiana e antitumoral. Este trabalho foi desenvolvido para isolar a fração alcalóide de folhas de *I. suffruticosa*, investigar sua atividade antitumoral e estudar a histologia e a morfometria do tecido hepático de camundongos portadores de sarcoma 180. O material da pesquisa foi obtido a partir de um screening fitoquímico de folhas onde foram realizados os protocolos extrativos para identificar e isolar a fração alcalóide presente na espécie. Camundongos albinos suíços (*Mus musculus*), machos, adulto-jovens, 40 dias de idade, pesando em média 25 a 35g foram divididos em três grupos de 6 animais: G1 (portadores de sarcoma/salina), G2 (sem sarcoma/salina) e G3 (sarcoma/fração alcalóide). Nos grupos G1 e G3 foram injetados na área axilar direita uma suspensão de aproximadamente 0,3 ml de células do Sarcoma 180 (3×10^6 células/ml). Após 48 horas da implantação tumoral, a quimioterapia foi iniciada no grupo G3 com a fração alcalóide (25mg/kg.ip), G1 e G2 com salina (1.4ml/Kg). Após sete dias de tratamento os animais foram eutanaziados por deslocamento cervical, os tumores foram analisados e fragmentos de fígado foram utilizados para o estudo histológico e morfométrico. A fração alcalóide isolada, obtida do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* não reduziu significativamente o volume médio de Sarcoma 180 no grupo G3 comparado com G1. De acordo com o estudo histopatológico e morfométrico o tecido hepático de G2 e G3 apresentou arquitetura normal, quando comparado com G1 que mostrou congestão hepática. Esta pesquisa demonstrou que a fração alcalóide isolada de folhas de *I. suffruticosa* não inibiu o crescimento tumoral, por outro lado o estudo histológico, apresentou a arquitetura preservada do tecido hepático sugerindo um meio alternativo hepatoprotetor.

Palavras-chave: Fração alcalóide, Atividade antitumoral, Histologia, Morfometria, Fígado.

ABSTRACT

Indigofera suffruticosa Mill (Fabaceae) occurs in abundance in Northeastern Brazil and has strong popular use in the treatment of infections, inflammation and other processes. Pharmacological studies of the aqueous extract of leaves showed biological activities as: antiinflammatory, embryotoxic, antimicrobial and antitumor. This study was conducted to isolate an alkaloid fraction of leaves of *I. suffruticosa*, investigate the antitumor activity and study the histology and morphometry of the liver tissue of mice bearing sarcoma 180. The plant sample was obtained from a phytochemical screening of leaves and extractive protocols to identify and isolate the fraction of alkaloids present in the specie. Was realized Swiss albino mice (*Mus musculus*), male, young adults, 40 days old, weighing from 25 to 35g were divided into three groups of six animals: G1 (sarcoma / saline), G2 (without sarcoma / saline) and G3 (sarcoma / alkaloid fraction). In groups G1 and G3 were injected into the right axillary area a suspension of approximately 0.3 ml of Sarcoma 180 (around 3×10^6 cells). After 48 hours of tumor implantation, the treatment was initiated in G3 with alkaloid fraction (25 mg/Kg), G1 and G2 with saline (1.4 ml/Kg). After seven days treatment, the animals were euthanized by cervical dislocation and pieces of the liver were used for histological and morphometric analyses. The fraction of alkaloids obtained from leaves of *I. suffruticosa* did not reduce significantly the mean volume of Sarcoma 180 in group G3 compared with control G1. Histopathological and morphometric analysis of liver of G2 and G3 showed normal tissue architecture, compared to G1 that showed a liver congestion. This research demonstrated that the alkaloid fraction isolated from the leaves of *I. suffruticosa* did not inhibit tumor growth, on the other hand, the histological study showed a preservation of liver architectures suggesting an alternative way of hepatoprotection.

Keywords: Alkaloid fraction, Antitumor activity, Histology, Morphometry, Liver

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Indigofera suffruticosa</i> Mill	29
Figura 2.	Degradação térmica a 100°C do extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> durante 10min (A), 20min (B) e 30min (C).	32
Figura 3.	Representação esquemática da obtenção do extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> .	32
Figura 4.	Representação esquemática da obtenção da Fração alcalóide de folhas de <i>I. suffruticosa</i> .	33
Figura 5.	Cromatograma do Indican de folhas de <i>I. suffruticosa</i> (3 bandas).	38
Figura 6.	Cromatograma do Índigo (A) e Indirubina (B) de folhas de <i>I.suffruticosa</i> . P: Padrão Indican.	38
Figura 7.	Derivados indigóides obtidos de folhas de <i>I. suffruticosa</i> armazenadas em diferentes temperaturas. Na 1 ^a linha extrato aquoso de folhas em 5°C (presença do Índigo e Indirubina) e 2 ^a linha - extrato aquoso de folhas à temperatura ambiente (ausência do Índigo e Indirubina).	39
Figura 8.	Cromatograma do Indican durante o processo de hidrólise do extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> A - 10min/menores bandas; B - 20min/maiores bandas; C - 30min/ausência de bandas).	40
Figura 9.	Aspecto geral dos tumores (Sarcoma 180) após sete dias de tratamento. G1- Sarcoma/salina; G3- Sarcoma 180/ Fração de alcalóides.	41
Figura 10.	Efeito do tratamento sub-crônico da fração de alcalóides bis-indólicos de folhas de <i>I. suffruticosa</i> em camundongos albinos suíços portadores de Sarcoma 180. Os dados estão expressos como média ± SD. N =12. * p = 0,129. O grupo G3 foi comparado com o grupo G1.	42

- Figura 11. (A, B e C) - Fotomicrografias de fígado de camundongos: (A) portadores de sarcoma 180/Fração alcalóide; (B) sem sarcoma 180/ salina; (C) com sarcoma 180/salina. Fixação – formalina, coloração – HE. Cordões de hepatócitos - CH; Capilares sinusóides -S e Veia central - CV. Aumento = 40x. 43
- Figura 12. Morfometria dos diâmetros dos capilares sinusóides hepáticos de camundongos: Sinusóides- G1 (portadores de sarcoma 180/Fração alcalóide); Sinusóides- G2 (sem sarcoma 180 /salina) e sinusóides G3 (com sarcoma 180/salina). Os dados estão expressos em análise de variância usando o teste de Tukey ($P = <0,001$) N – 3. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Metabólitos, sistema de eluição e reveladores utilizados para o screening fitoquímico de extrato aquoso de folhas <i>I. suffruticosa</i> .	31
Tabela 2.	Metabólitos do extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> .	37

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Gerais	
2.2. Específicos	
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1. Plantas Medicinais	17
3.2. <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill	18
3.2.1. Família Fabaceae	18
3.2.2. Gênero <i>Indigofera</i>	19
3.2.3. Espécie <i>I. suffruticosa</i>	19
3.2.4. Fitoquímica	20
3.2.4.1. Alcalóides	21
3.3. Câncer	23
3.3.1. Linhagens Tumorais	25
3.3.1.1. Sarcoma 180	26
3.4. Fígado	26
3.4.1. Hepatócitos	27
3.4.2. Sinusóides Hepáticos	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Coleta do material vegetal	29
4.2. Métodos Cromatográficos	30
4.3. Animais experimentais	30
4.4. Linhagem celular neoplásica	30

4.5. Ensaio Fitoquímico de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	30
4.5.1. <i>Screening</i> Fitoquímico	30
4.5.2. Influência da temperatura na obtenção dos derivados alcalóides bis- indólicos de folhas <i>I. suffruticosa</i> .	31
4.5.3. Cinética de hidrólise de extrato aquoso de folhas <i>I. suffruticosa</i> .	31
4.6. Obtenção do extrato aquoso de folhas <i>I. suffruticosa</i> .	32
4.6.1. Obtenção da fração de alcalóides de folhas <i>I. suffruticosa</i> .	32
4.7. Estudo da atividade antitumoral em camundongos portadores de sarcoma 180.	33
4.7.1. Avaliação da fração de alcalóides de folhas de <i>I. suffruticosa</i> após o tratamento sub-crônico em camundongos.	33
4.7.2. Estudo histológico e morfométrico do fígado dos camundongos.	35
4.8. Análise estatística	36
5. RESULTADOS	37
5.1. Ensaio Fitoquímico da <i>I. suffruticosa</i>	37
5.1.1. <i>Screening</i> fitoquímico	37
5.1.2. Influência da temperatura na obtenção dos derivados indigóides de folhas de <i>I. suffruticosa</i> .	39
5.1.3. Cinética de hidrólise de extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> .	39
5.2. Extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> .	40
5.3. Fração de alcalóides de folhas de <i>I. suffruticosa</i> .	40
5.4. Estudo da atividade antitumoral em camundongos portadores de sarcoma 180.	40
5.4.1. Efeito do tratamento sub-crônico da fração de alcalóides de folhas de <i>I. suffruticosa</i> em camundongos	40
5.4.2. Estudo histológico e morfométrico do fígado de camundongos	42
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÕES	50
8. PERSPECTIVAS	51

1. INTRODUÇÃO

O aumento mundial do número de casos de câncer tem provocado uma corrida dos pesquisadores na busca de soluções para a cura ou o controle desta patologia. Apesar da existência de inúmeros produtos farmacêuticos, naturais ou sintéticos, que são utilizados no tratamento do câncer, as particularidades biológicas inerentes a cada tipo de tumor, juntamente com a resistência às drogas quimioterápicas que as células tumorais podem desenvolver, impulsionam a busca de novos produtos com atividade antineoplásica (O'PESSOA, 1992).

A quimioterapia percorre estreito caminho entre a eficácia e a toxicidade. De fato, os protocolos quimioterápicos estão muito freqüentemente limitados, não pelo grau de mortalidade das células tumorais, mas pelas ações tóxicas ao paciente (MACEWEN, et al., 1992).

O maior avanço da quimioterapia tem sido sua habilidade em evitar a dispersão ou metástase do câncer, o que não se consegue através da cirurgia. A reação aos agentes quimioterápicos em cada paciente é única e em geral com muitos efeitos colaterais. Esse fato estimula a procura por agentes com efeitos menos tóxicos. A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais (HAVSTEEEN et al., 1983; CALIXTO et al., 1990; CECHINEL FILHO, 1998). Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de no futuro serem utilizadas como agentes medicinais.

O paclitaxel (Taxol) é um diterpeno complexo da família dos taxanos que foi extraído em 1962 a partir de extratos de casca da árvore conhecida como yem, *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) (ALTMANN et al., 2007). Em 1970 o taxol teve sua estrutura química determinada e em 1980 cientistas do Albert Einstein Medical College registraram sua atuação sobre a tubulina dos microtúbulos, inibindo a divisão celular (WANI et al., 1971). Em 1992 a The Food and Drug

Administration (FDA) aprovou o taxol contra o câncer de ovário reincidente. Hoje a droga é usada para vários cânceres, incluindo mama, pulmão e Sarcoma de Karposi (AGUS et al., 1999).

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos que deve ser observado consiste nas informações da medicina popular. Dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (MONTELLANO, 1975; FARNSWORTH, 1981; UNANDER, 1995).

No Brasil, a utilização de plantas medicinais para o tratamento de enfermidades está arraigada às culturas indígena, negra e dos imigrantes europeus. Por muito tempo tal procedimento representou a principal forma de cura, especialmente entre a população rural. Entretanto, com o processo de urbanização e o desenvolvimento da indústria química, os medicamentos sintéticos passaram a predominar na terapia moderna. (SIQUEIRA, 2006).

O reconhecimento e o resgate da sabedoria popular sobre as plantas medicinais são fundamentais às famílias rurais, pelo fato da fitoterapia caseira ser uma fonte de cura, muitas vezes a única devido à falta de outros recursos para cuidar da saúde. A cultura popular rural representa a base de informação para a pesquisa científica e a indústria farmacêutica, ou seja, é ponto de partida para o desenvolvimento dos fitoterápicos e outros medicamentos industrializados (LÓPEZ, 2006).

Com o objetivo de possibilitar uma melhor compreensão do tema e desse modo abrir perspectivas para a elaboração de pesquisas mais acuradas de plantas de expressivo potencial terapêutico o Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia e o Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Farmácia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco vêm desenvolvendo experiências com plantas medicinais da flora nordestina que são estudadas quanto a seus constituintes e propriedades biológicas. Alguns desses estudos relacionados a *Indigofera suffruticosa* Mill apresentaram importantes atividades biológicas como atividade antiinflamatória (LEITE et al., 2003), atividade embriotóxica (LEITE et

al., 2004), atividade antimicrobiana (LEITE et al., 2006) e atividade antitumoral (VIEIRA et al., 2007).

A *I. suffruticosa* Mill conhecida popularmente como anil do campo ou anileira é uma planta da família Fabaceae originária da Índia, comum em toda a região tropical e subtropical, é uma leguminosa utilizada na adubação verde e cobertura dos solos. (BRAGA, 1976.). No Brasil, encontrada praticamente em todo país, é uma forrageira anual ou perene adaptada à região do Sertão Pernambucano. (BRAGA, 1976.). Os órgãos vegetativos de *I. suffruticosa* apresentam valor medicinal (VIEIRA, 1992; MARTINS et al., 2000), como antiespasmódico, sedativo, estomáquico e antídoto contra o mercúrio e o arsênio (MARTINS et al., 2000). É utilizada no tratamento de úlceras (MARTINEZ, 1933; STANDLEY, 1922), atividade antiinflamatória, analgésica e digestiva (ROIG, 1988). Sua raiz é empregada ainda como febrífuga, diurética, purgativa e insetífuga (VIEIRA, 1992). Estudos farmacológicos mostraram que a planta apresenta ação toxicológica e toxicogénética (RIBEIRO et al., 1991). Pesquisas recentes tem realizado trabalho para explorar o potencial desta planta e dar base científica a sua utilização (LEITE et al., 2003, 2004, 2006, VIEIRA et al 2007, 2011). Devido a grande parte do arsenal terapêutico utilizado no tratamento do câncer ter um impacto significativo sobre o fígado, observações histológicas são ferramentas importantes para detectar alterações de tecidos e células causados por compostos xenobióticos (BRASIL, 2006) A diversidade de informações sobre o assunto leva a formulação da hipótese sobre a eficácia terapêutica e/ou sobre a toxicidade da planta. Para comprovar estes dados, objetivou-se avaliar a atividade antitumoral da fração de alcalóides de folhas de *I. suffruticosa* purificada e analisar seus efeitos no fígado a níveis histológico e morfométrico.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

- Avaliar os aspectos Histológicos e Morfométricos do epitélio do fígado em camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) portadores de sarcoma 180 sob ação da fração de alcalóides obtida de folhas de *I. suffruticosa*.

2.2. Específicos

- Identificar a classe química de alcalóides em folhas de *I. suffruticosa*.
- Isolar a fração de alcalóides de folhas de *I. suffruticosa*.
- Avaliar a inibição tumoral em camundongos albinos suíços portadores de sarcoma 180 após tratamento subcrônico com a fração de alcalóides de *I. suffruticosa*.
- Analisar histologicamente e morfometricamente o epitélio glandular do fígado de camundongos portadores de Sarcoma 180 após o tratamento subcrônico com a fração de alcalóides de *I. suffruticosa*.

3. REVISĀO DE LITERATURA

3.1. Plantas Medicinais

A OMS (Organização Mundial de Saúde) (1998) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgāos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (JUNIOR; PINTO; MARCIEL, 2005).

O mercado mundial de fitoterápicos gira em torno de 14 bilhōes de dólares, representando cerca de 5% do mercado mundial de produtos farmacêuticos CARVALHO et al., 2007). No Brasil, esse mercado tem crescido numa taxa de 15% ao ano, valor este elevado quando comparado ao crescimento anual do mercado de medicamentos sintéticos (3-4% ao ano) (SIMÕES et al., 2004). De acordo com Newman e colaboradores (2003), entre os anos de 1981 e 2002, de 877 novas moléculas introduzidas no mercado, em torno de 49% eram substâncias isoladas de produtos naturais, semissintéticos, derivados de produtos naturais ou então moléculas sintetizadas tomando como modelo estruturas de origem natural. A possibilidade de se encontrar novas moléculas a partir de produtos naturais é imensurável (GURBUZ et al., 2002).

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para a terapia, como é conhecido atualmente, possui pouco mais de 100 anos de existência. Dois fatores foram fundamentais para a consolidação deste processo: o estabelecimento dos princípios e métodos da química, permitindo a resolução de vários problemas práticos (principalmente fora do escopo da própria química) e o estabelecimento da farmacologia como uma disciplina bem estruturada (DREWS, 2000).

Além de fornecer princípios ativos para o emprego direto na terapia, as plantas medicinais também podem ser utilizadas como fitoterápicos, os quais são definidos como preparações padronizadas, constituídas de misturas complexas de uma ou mais plantas, usadas para o tratamento de várias doenças (CALIXTO, 2000). Neste caso, tanto a atividade farmacológica como os

compostos responsáveis por esta atividade devem estar bem definidos (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003)

Em suma, as plantas medicinais representam uma reserva praticamente inexplorada de substâncias úteis à humanidade. Aproximadamente 420 mil espécies vegetais são conhecidas (BRAMWELL, 2000), e menos de 5% destas foram avaliadas para uma ou mais atividades biológicas (VERPOORTE; VAN DER HEIJDEN; MEMELINK, 2000). Diante deste quadro, e também diante do fato que uma única planta poder conter várias substâncias químicas diferentes, percebe-se a riqueza de entidades moleculares novas contidas no reino vegetal que ainda podem ser descobertas (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

3.2. *Indigofera suffruticosa* Mill

3.2.1. Família Fabaceae

Fabaceae é a terceira maior família de fanerógamas com aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies (LEWIS et al., 2005). A família apresenta distribuição cosmopolita e ocorre abundantemente em diversas formações vegetais, provavelmente devido à sua capacidade de fixar nitrogênio atmosférico por meio de associação simbiótica com bactérias em nódulos radiculares (LEWIS et al., 2005, SPRENT, 2001). No sensu de Cronquist - 1981, pertence a subclasse Rosidae que é formada por plantas consideradas sob ponto de vista evolutivo como intermediário entre Magnoliidae primitivas e Asteridae avançadas.

No Brasil, há 2.100 espécies reunidas em 188 gêneros (FILARDI, 2005). O termo Leguminosae, apesar de não apresentar a desinência oficial para a categoria de família, é bastante difundido e alguns estudiosos defendem seu uso, pois o nome Fabaceae pode ser entendido como referente à Papilionoideae (=Faboideae) (LEWIS & SCHRIRE, 2003). Apesar de alguns autores considerarem como três famílias distintas, há um crescente número de evidências que apóiam o grupo como sendo monofilético (WOJCIECHOWSKI et al., 2004) dividindo-a em 3 subfamílias (Papilionoideae, Mimosoideae e Caesalpinoideae). Dessas, as duas primeiras formam clados

monofiléticos e a terceira forma um grupo parafilético basal (LOUIS et al., 2007). A morfologia da família é muito variada, tanto no hábito, desde grandes árvores até ervas muito pequenas, como nas folhas e flores, provavelmente relacionadas à alta diversidade de polinizadores do grupo (JUDD et al., 1999). Entretanto a principal característica que une a família é o fruto (legume), formado por um único carpelo, com um lóculo, placentação marginal ao longo da sutura adaxial e vários óvulos, embora alguns membros tenham frutos tão modificados que raramente lembrem legumes (POLHILL, 1994).

Além de ecologicamente importante a família é de grande relevância econômica, sendo a segunda família mais importante ao homem, perdendo apenas para Poaceae. Mais de 80 espécies são consumidas no mundo e representam a segunda maior fonte de alimento. (SOSULSKI & SOSULSKI, 2006). Dentre as leguminosas, existem também muitas espécies ornamentais, outras são valiosas fontes de madeira e muitas são conhecidas por suas propriedades medicinais, já tendo sido isoladas e caracterizadas milhares de substâncias (POLHILL, 1994; SIMPSON & OGORZALY, 2001; JUDD et al., 2002).

3.2.2. Gênero *Indigofera*

Segundo Lewis (2005), os três maiores gêneros de Leguminosae seriam: *Astragalus* (Leguminosae-Papilionoideae, ca. 2.400 espécies), *Acacia sensu latu* (Leguminosae-Mimosoideae, cerca de 1.450 espécies) e *Indigofera* (Leguminosae-Papilionoideae, cerca de 700 espécies). O gênero *Indigofera*, comprehende espécies herbáceas e arbustivas com ocorrência em regiões tropicais e subtropicais das Américas, África, Austrália e Ásia (MOREIRA & AZEVEDO TOZZI, 1997).

3.2.3. Espécie *Indigofera suffruticosa*

Conhecida popularmente como “anil do campo” ou “anileira”, *Indigofera suffruticosa* é utilizada na cultura tradicional no tratamento de diversos problemas de saúde (HASTINGS, 1990).

Os órgãos vegetativos de *I. suffruticosa* apresentam valor medicinal como antiespasmódico, sedativo, estomáquico e antídoto contra o mercúrio e o arsênio (MARTINS et al., 2000). Sua raiz é empregada como febrífuga, diurética, purgativa e insetífuga (VIEIRA, 1992). Também possui propriedades medicinais nos tratamentos de febres, parasitoses, doenças de pele e problemas cardíacos (ALLEN et al., 1981). Vieira (2007) observou uma inibição significativa do crescimento de tumores sólidos tratados com extrato aquoso de folhas de *Indigofera suffruticosa*.

3.2.4. Fitoquímica

As primeiras investigações sobre a bioquímica do gênero *Indigofera* foram desenvolvidas por Miller e Smith (1973), que se referem à espécie *I. suffruticosa*, como uma fonte rica em aminoácidos com prováveis ações tóxicas, utilizando extratos de sementes.

A partir de levantamento realizado no banco dados do *Natural Products Alert* (NAPRALERT, 2003) e do *Chemical Abstracts*, foi possível traçar um perfil onde se observa a ocorrência dos alcalóides, polifenóis, terpenóides e/ou esteróides, açúcares redutores, proteínas e indigóides.

Leite (2003) em estudos fitoquímicos utilizando *Indigofera suffruticosa* constatou a presença predominante de alcalóides, polifenóis, triterpenóides e/ou esteróides nas folhas desta planta enquanto testes histoquímicos realizados por Barros (2008) indicaram a presença fortemente positiva de proteínas nas folhas, lipídios e alcalóides nas raízes e compostos fenólicos no caule. Em 1979, Gustine verificou a presença de nitro componente em *I. suffruticosa* e Kamal e colaboradores (1993) identificaram, caracterizaram e quantificaram 6 rotenóides da mesma planta ativos contra larvas de *Anopheles* e *Callosobruchus chinensis* adultos. Após análise quantitativa de proteína e fibra bruta de *I. suffruticosa* Paiva e colaboradores (1987) verificou que pode ser utilizada como forragem para ruminantes. Recentemente análises fitoquímicas das partes aéreas de *I. suffruticosa* detectaram a presença de glicerolipídios, flavonóides e alcalóides bis-indólicos (CALVO, 2009).

3.2.4.1. Alcalóides

Dentre as classes de compostos químicos encontrados em plantas está a dos alcalóides que são compostos orgânicos cíclicos contendo nitrogênio em um estado de oxidação negativo e de distribuição limitada entre os seres vivos (MANN et al., 1993). Estima-se que esta classe abranja mais de 4000 compostos, que correspondem a cerca de 15 a 20% dos produtos naturais conhecidos (CORDELL et al., 2001; VERPOORTE, 1986) e que está dividida em diferentes grupos (tropânico e quinolínico, dentre outros) com destaque para o grupo dos alcalóides indólicos, devido à sua grande diversidade em termos de estrutura e de propriedades farmacológicas.

Considerando esse último dado, aliado à movimentação da indústria farmacêutica (cerca de 300 bilhões de dólares/ano) e o fato de que aproximadamente 25% dos medicamentos utilizados no mundo são de origem vegetal conclui-se que os tratamentos à base desses alcalóides geram uma receita de aproximadamente 15 bilhões de dólares/ano, evidenciando sua importância em termos não só medicinais, como também econômicos (HARVEY, 2000; RATES, 2001). Apesar disso, um estudo feito no ano 2000 mostra que a maioria dos alcalóides conhecidos ainda não foi investigada quanto a possíveis atividades farmacológicas, constituindo-se em um campo promissor para pesquisas visando o desenvolvimento de novos fármacos (CORDELL et al., 2001).

Indigóides pertencem à classe de alcalóides bis-indólicos e são produtos naturais que têm uma longa história em razão do uso como tinturas (ENSLEY et al., 1983). O Índigo foi sintetizado em 1878 e o primeiro processo industrial foi desenvolvido em 1890 (GILLAM et al., 2000). Atualmente, processos envolvendo bactérias (*Escherichia coli*) são utilizados para obtenção destes corantes para uso comercial. Esses alcalóides estão sendo estudados para fins medicinais (NAM et al., 2005). Alcalóides indigóides são encontrados em plantas (MAUGARD et al., 2001), fungos (HOSOE et al., 1999) e na urina humana (GILLAM et al., 2000). No corpo humano, o indol é produto do catabolismo do triptofano através de bactérias do intestino e é absorvido em quantidades significativas. Ele é oxidado para indoxil e excretado na urina como indoxil (3- hidroxindol) sulfato.

Adicional oxidação e dimerização do indoxil levam a formação dos pigmentos indigóides. Em plantas esses pigmentos são característicos do gênero *Indigofera* (África, Ásia, América do Sul) e das espécies *Polygonum tinctorium* (China e Coréia) e *Isatis tinctoria* (Europa) (MAUGARD et al., 2001). *Indigofera* e *Polygonum* contêm indicana que é precursora dos pigmentos indigóides, enquanto *Isatis* contém isatana B como material de partida da biossíntese destes metabólitos (GARCIA- MACIAS & JOHN, 2004). Quando as folhas envelhecem os precursores são hidrolisados e o indoxil é oxidado espontaneamente gerando o índigo. Isatina é gerada paralelamente ao indoxil. A condensação de indoxil com isatina produz Indirubina. Assim há formação de *trans*-indigo (indigotina) e *trans*-indirubina (isoindigotina), além de *cis*-indigo, isoindigo, *cis*-indirubina (isoindirubina) (MAUGARD et al., 2001).

A literatura relata inúmeros estudos farmacológicos envolvendo alcalóides bis-indólicos, principalmente derivados da Indirubina, tais como atividade antiproliferativa e estudos genéticos (ADACHI et al., 2004), atividade anti-cancerígena (NAM et al., 2005), no tratamento da doença de Alzheimer (POLYCHRONOPOULOS et al., 2004), como antioxidante (BEUTNER et al., 2001), atividade antimicrobiana (MACNEIL et al., 2001), atividade antiinflamatória (IWAKI & KURIMOTO, 2002), atividade antimitótica (DAMIENS et al., 2001), atividade fungicida (MARERO et al., 1997) e atividade leishmanicida (GRANT et al., 2004), entre outras.

Em relação aos alcalóides isolados de *Indigofera* é interessante ressaltar que compostos contendo núcleo indólico são descritos na literatura por apresentarem a capacidade de inibir/modular enzimas específicas (proteínas quinases), as quais são reguladoras de processos celulares em tecidos e são associadas com ampla variedade de doenças (ISLAM et al., 2007; SUN et al., 1999). Hidrazonas contendo núcleo indólico apresentaram atividade antiinflamatória e analgésica (SONDHI et al., 2006).

3.3. Câncer

Câncer é o nome dado a uma série de doenças que tem em comum o crescimento celular

desordenado, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). No Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade. A maioria dos cânceres origina-se de uma única célula mutada. Uma vez mutada as células dividem-se rapidamente se tornando muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação dos tumores ou neoplasias malignas (BRASIL, 2008).

De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer atinge 9 milhões de pessoas, matando 5 milhões a cada ano, sendo a segunda causa de morte por doença. A OMS alerta para o fato de que, se não forem tomadas medidas de prevenção, a incidência de câncer aumentará em 100% nos próximos 20 anos (BRASIL, 2003).

Segundo dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer), as estimativas de Incidência de câncer para o Brasil no ano de 2010, válidas para o ano de 2011 apontam a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina. (BRASIL, 2009)

A carcinogēnese pode ser dividida em três etapas: início, promoção e progressão. A fase inicial envolve a exposição ao agente mutagênico e, muitas vezes, requer transformação metabólica subsequente em formas biológicas ativas. Esta exposição, mesmo que cause danos permanentes no DNA, muitas vezes é insuficiente por si própria para causar câncer. A presença de promotor tumoral é necessária para estimular a divisão celular e assim, resultar em pequenos tumores benignos, em experimentos com animais e indução de tumores químicos. Possivelmente, uma fase promotora semelhante deve ocorrer em tumores de ocorrência natural. A progressão para tumor maligno ocorre quando é alterado o controle rígido que normalmente governa a progressão do ciclo celular, resultando em proliferação desordenada de células cancerosas. Esta etapa também envolve a

habilidade destas células em invadir tecidos circunvizinhos e eventualmente causar metástase (BORSCHERS; KEEN; GERSHWIN, 2004).

A importância das neoplasias reside em seus efeitos sobre as pessoas. Todos os tumores, até mesmo os não invasivos, podem causar morbidade e mortalidade. Além disso, cada novo crescimento tumoral requer cuidadosa avaliação devido ao receio de que seja maligno (KUMAR; COTRAN, 2000). O principal objetivo do tratamento do câncer é obter a completa erradicação das células tumorais. Tal resultado pode, muitas vezes, ser obtido através de procedimentos como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, utilizados de forma isolada, ou em associação (KUMAR; COTRAN, 2000; BRASILEIRO FILHO, 2004).

A cirurgia é o meio simples e seguro para remover tumores sólidos mas não na maioria dos pacientes que apresentam a doença metastática. A radioterapia pode ser curativa para tumores localizados, preservando a estrutura e funcionamento do órgão ou tecido, mas tem suas limitações no tratamento de tumores volumosos. Já a quimioterapia, um tratamento que envolve o uso de fármacos citotóxicos, deveria erradicar o câncer sem prejudicar os tecidos normais, mas a maioria destas drogas causa significativos efeitos colaterais. Esses fármacos são mais efetivos contra tumores de proliferação rápida do que contra alguns dos tumores de crescimento lento e são mais tóxicos para células de crescimento rápido do que para os tecidos normais do hospedeiro. Entretanto, tais agentes antiproliferativos podem ter importantes efeitos colaterais em tecidos normais que se dividem rapidamente, como a medula óssea, mucosa gastrintestinal e pele (KO; WANG; FERRONE, 2003; BUBENÍK; VONKA, 2003).

A necessidade de agentes antiinvasivos e/ou tumoricidas mais eficientes e menos onerosos tem levado à busca de novos compostos com ação farmacológica tanto no controle do crescimento das células tumorais como na modulação das moléculas de adesão que permitem as metástases. Neste sentido, nos últimos anos tem crescido também o interesse por produtos de origem vegetal na busca de terapias mais eficazes (NEWMANN; GRAGG; SNADER, 2003).

Alguns compostos anticancerígenos, cujos exemplos clássicos são os alcalóides vimblastina e vincristina, isolados de *Catranthus roseus* (Apocynaceae) (BALUNAS e KINGHORN, 2005) e, mais recentemente, o taxol, alcançam preços elevados no mercado mundial, evidenciando o potencial econômico que uma espécie medicinal pode ter (CRAGG, 1999). Alguns estudos revelaram novos princípios ativos vegetais com atividade antiproliferativa, tais como substâncias isoladas da *Cephalotaxus harringtonia* e de espécies da família Apocynaceae, que têm apresentado eficácia contra leucemias e câncer de mama, respectivamente (NEWMAN e CRAGG, 2007).

3.3.1. Linhagens Tumorais

Historicamente, uma das principais dificuldades para descobrir novas drogas para o tratamento de câncer e predizer sua atividade clínica é a falta de um modelo em laboratório que recapitule a total complexidade da doença. No entanto, linhagens celulares derivadas de tumores têm sido amplamente utilizadas para estudo da biologia tumoral bem como para avaliação de potenciais agentes candidatos a quimioterápicos. (SHARMA et al., 2010).

O desenvolvimento de linhagens celulares comerciais tem como principal vantagem o fato de constituírem uma fonte quase inesgotável de amostras celulares com relativa uniformidade de características biológicas. Outra vantagem deste modelo é que estas linhagens são capazes de formar tumores quando implantadas em animais, permitindo um melhor entendimento acerca da patofisiologia do tumor *in vivo*, isto é, o estudo das interações com o microambiente tumoral, invasão ao tecido circundante, metástases, entre outros. Além disso, este modelo permite um melhor estudo a respeito de drogas com potenciais quimioterápicos (SHARMA et al., 2010).

3.3.1.1. Sarcoma 180

O Sarcoma 180 ou Tumor de Crocker é um tumor indiferenciado que foi encontrado em ratos albinos machos em 1914. Estudos de microscopia eletrônica mostram contatos intercelulares característicos de células de origem epitelial, indicando ser esta neoplasia um carcinoma

(ZUCKERBERG, 1973). Histologicamente apresenta-se como massa sólida formada por células poliédricas de citoplasma basófilo e núcleo central, arranjadas em ninhos ou cordões. O pleomorfismo é acentuado. Há estroma conjuntivo vascularizado, circundando e permeando o tumor. Frequentemente há necrose central. Pode ser transplantado por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal e cresce rapidamente em 90% a 100% dos animais inoculados, havendo regressão natural em 8% a 10% desses. Em geral ocorre ulceração da pele ao redor do 28º dia após a inoculação subcutânea e os animais morrem em geral entre o 28º e o 30º dia (ZUCKERBERG, 1972; KAWAKUBO et al., 1980).

3.4. Fígado

O fígado é um dos órgãos mais afetados por lesões provocadas por drogas, devido a sua importante participação em reações de metabolismo, na biotransformação de substâncias químicas no organismo. As lesões hepáticas associadas ao uso de drogas abrangem desde alterações bioquímicas e estruturais adaptativas até lesão morfológica com danos muitas vezes irreversíveis do metabolismo ou da estrutura celular (BRASILEIRO FILHO, 2000).

A maioria das drogas consiste em substâncias lipossolúveis que circulam ligadas a proteínas plasmáticas até alcançarem o fígado, que é o principal sítio de biotransformação no organismo tendo como função básica transformá-las em substâncias hidrossolúveis para posterior eliminação biliar ou renal (BRASILEIRO FILHO, 2000).

As agressões hepáticas podem gerar alterações enzimáticas sem lesão morfológica. O aumento do nível das enzimas hepatobiliares é um dos marcadores mais sensíveis de doença hepática induzida por drogas. (BRASILEIRO FILHO, 2000). Algumas das enzimas consideradas indicadoras de hepatotoxicidade celular são as seguintes: alanina-trasaminase (TGP), aspartato-transaminase (TGO) e a fosfatase alcalina.

As transaminases, alanina e aspartato, possuem um importante papel no metabolismo de proteínas e de hidratos de carbono e são amplamente distribuídas nos tecidos animais. Tanto a alanina-transaminase como a aspartato-transaminase existem normalmente no plasma sangüíneo humano, na bile, no líquido cefalorraquídiano e na saliva. (KING, 1968).

As fosfatases alcalinas estão presentes em quase todos os tecidos e fluidos humanos, são fontes particularmente ricas o intestino delgado, os ossos, a glândula mamária, durante a lactação, e o rim. Os níveis de fosfatase alcalina sérica nas enfermidades do fígado, se encontram elevados. (KING, 1968).

Dados morfométricos normais em fígado de ratos foram descritos por Weibel et al. (1969). Segundo os autores estudos pela microscopia de luz demonstraram que 96% do volume hepático dos ratos são constituídos pelo parênquima lobular, isto é, pelos hepatócitos, sinusóides, espaços de Disse e capilares biliares, enquanto os 4% restantes constituem o parênquima não lobular, ou seja, espaços portais, veias centro-lobulares e ramos da veia hepática.

3.4.1. Hepatócitos

O fígado é constituído principalmente por células hepáticas. O hepatócito é a célula mais multifuncional do organismo, de forma poliédrica com 6 ou mais faces e medem de 20 a 30 µm de diâmetro. Esta célula apresenta um núcleo central, arredondado, com um ou dois nucléolos bem evidentes. Os retículos endoplasmáticos são bem evidentes. Possui funções glandulares endócrinas e exócrinas e, além de sintetizar e acumular vários compostos, neutraliza outros e transporta corantes do sangue para a bile. Após as refeições, os hepatócitos convertem o excesso de glicose a glicogênio. Eles desempenham inúmeras funções metabólicas úteis, como a utilização de lipídios para a síntese de lipoproteínas, a degradação de hormônios esteróides e a destoxificação de medicamentos e toxinas. Essas células epiteliais se agrupam em placas que se anastomosam entre si formando unidades morfológicas, os lóbulos hepáticos. Cada lóbulo é uma massa poliédrica de

tecido hepático de mais ou menos 0,7 por 2 mm de tamanho. As regiões nos cantos dos poliedros são denominadas espaços porta, compostos por 1 vênula, 1 arteríola, 1 ducto biliar e vasos linfáticos. Nos lóbulos os hepatócitos se dispõem em cordões orientados radialmente. Os cordões são constituídos por células dispostas em uma só camada que são perfuradas e, frequentemente, anastomosam-se, resultando num labirinto complexo, que dá ao lóbulo hepático um aspecto esponjoso (ROUILLER, 1964; GUYTON, 2002; GARTNER; HIAT, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3.4.2. Sinusóides Hepáticos

O espaço que fica entre os cordões de células hepáticas são os chamados sinusóides, ou seja, capilares hepáticos de paredes revestidas por células endoteliais típicas dos capilares sanguíneos. O capilar sinusóide apresenta-se envolto por um delicado arcabouço de fibras reticulares e neles desembocam ramos capilares terminais da artéria hepática que trazem oxigênio para o parênquima hepático. Os capilares sinusóides desembocam na veia centrolobular, no centro do lóbulo e medem entre 10 e 30 μm de diâmetro. Seu endotélio é fenestrado e se assenta sobre uma membrana basal descontínua. Além disso, a junção entre as células endoteliais contíguas é incompleta e há separações de 0,1 a 0,5 μm . Os sinusóides hepáticos se diferenciam dos outros sinusóides do organismo porque entre suas células endoteliais estão intercalados macrófagos conhecidos como células de Kupffer (GUYTON; HALL, 2002; CORMACK, 2003; GARTNER; HIAT, 2003; HIB, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Coleta do material vegetal

O vegetal foi coletado na fase adulta, no período de floração. O material para estudo botânico foi acondicionado em sacos plásticos e transportado até o laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade federal de Pernambuco (UFPE) onde foi efetuada a herborização e destinado ao protocolo fitoquímico, procedendo-se seu encaminhamento ao Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia da UFPE para as operações extractivas.

O material vegetal utilizado neste trabalho, folhas de *Indigofera suffruticosa*, (Figura 1) foi coletado na cidade de Nova Cruz no Estado de Pernambuco no período de julho de 2008 (8 horas da manhã). As folhas foram separadas, pesadas e utilizadas para o estudo fitoquímico e atividade biológica. A amostra autenticada pela Bióloga Marlene Barbosa do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) encontra-se catalogada sob o número 43694 no Herbário do Centro de Ciências Biológicas da UFPE.



Figura 1. *Indigofera suffruticosa* Mill

4.2. Métodos cromatográficos

Nas placas de cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada Sílica-gel 7747 (60PF 254) da Merck, com espessura de 0,25 mm. As análises por CCD foram realizadas em cuba saturada, com migração ascendente. As cromatografias de coluna (CC) foram realizadas utilizando-se gel de Sephadex LH20.

4.3. Animais experimentais

Foram utilizados 18 camundongos albinos suíços machos (*Mus musculus*), saudáveis, com idade de 40 dias, pesando em média 25 a 35g, provenientes do Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Recife, Pernambuco/Brasil. Os animais receberam água e dieta (LABINA Purina-Brasil) “*ad libitum*” e foram mantidos em condições normais de temperatura e umidade sob ciclo natural claro e escuro de 12/12 horas. Os experimentos com animais foram realizados de acordo com o Protocolo do Instituto Nacional do Câncer (GERAN et al., 1972) e com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob ofício de número 33/06, processo 009528/2006-60 de julho de 2005. Todas as recomendações da Lei Nacional N° 6.638, 05/11/1979 para manuseio científico dos animais foram respeitadas.

4.4. Linhagem celular neoplásica

Foi utilizado o sarcoma 180 mantido nos animais por transplante da suspensão de células tumorais (STOCK et al, 1955). O sarcoma 180 foi obtido no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco/ UFPE.

4.5. Ensaio fitoquímico de folhas de *I. suffruticosa*

4.5.1. Screening fitoquímico

Cerca de 15g de folhas frescas de *I. suffruticosa* foram trituradas e submetidas à infusão com água (3mL) sob agitação durante 30 minutos. Os extratos de folhas de *I. suffruticosa* obtidos por infusão foram submetidos à filtração simples em papel de filtro e posteriormente, analisados por

cromatografia em camada delgada (CCD), empregando-se sistema de desenvolvimento e revelador adequado (MARKHAN, 1982). Foi investigada a presença de alcalóides bis-indólicos (Indican, Índigo e Indirubina) (Tabela 1).

Tabela 1 - Metabólitos, sistema de eluição e reveladores utilizados para o screening fitoquímico de extrato aquoso de folhas *I. suffruticosa*.

Metabólitos	Sistema de Eluição	Reveladores	Referências
Alcalóides	AcOEt-HCOOH- AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	Dragendoff	(WAGNER, 1984)
Indican	AcOEt-HCOOH- AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	Vanilina Clorídrica	(MARKHAN, 1982)
Índigo/Indirubina	AcOEt-HCOOH- AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	UV	(MARKHAN, 1982)

4.5.2. Influência da temperatura na obtenção da Fração de alcaloides de folhas de *I. suffruticosa*.

Foi investigada a influência da temperatura para a obtenção dos derivados alcalóides bis-indólicos utilizando-se 300g de folhas divididas em duas partes iguais (150g), armazenadas à temperatura ambiente e à 5°C durante 4 dias. O material vegetal foi submetido à extração aquosa para investigar a presença de bandas dos derivados indigóides. As bandas foram analisadas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) utilizando como fase móvel o sistema: AcOEt - HCOOH - AcOH - H₂O (100:11:11:27 v/v)

4.5.3. Cinética de hidrólise de extrato aquoso de folhas de *I.suffruticosa*

O extrato aquoso (12 ml) foi submetido à hidrólise ácida e condição térmica de degradação para obter a fração de alcalóides das folhas de *I. suffruticosa*. O extrato foi hidrolisado com ácido clorídrico (HCl-86 ml) a 50% e posteriormente foi realizada a degradação térmica (100°C) em

diferentes tempos: 10, 20 e 30 minutos (figura 2). Alíquotas de 4 ml foram analisadas por CCD como descrito anteriormente.

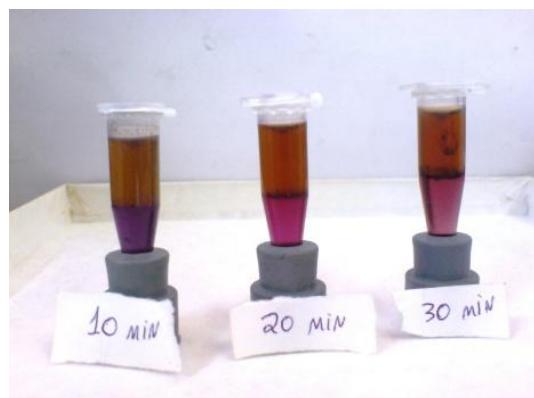


Figura 2. Degradação térmica a 100°C do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* durante 10min (A), 20min (B) e 30min (C).

4.6. Obtenção do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*

Com base nos resultados dos ensaios preliminares fitoquímicos, o extrato aquoso foi obtido a partir de 1,5 Kg de folhas recém-coletadas reduzidas a pequenos fragmentos. Folhas armazenadas por 4 dias à 5°C foram trituradas e os procedimentos extrativos foram realizados com água. A infusão foi preparada com 1,5 Kg de folhas em 4 L de água à 40°C por 10min sendo o resíduo sólido removido por filtração. (LEITE, 2003) (figura 3). O extrato aquoso foi liofilizado (Liofilizador L 101/ Liotop) (figura 4) e posteriormente utilizado para obter a fração de alcalóides.



Figura 3. Representação esquemática da obtenção do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*

4.6.1. Obtenção da fração de alcalóides de folhas de *I.suffruticosa*.

O extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* liofilizado (4g) foi submetido à cromatografia de coluna (CC), empregando-se como fase estacionária Sephadex LH20 (178g) e procedendo a

eluição com metanol. Das frações coletadas em diferentes tubos de ensaios ($n= 36/ 20 \text{ ml cada}$), 17 foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD), empregando-se placas prontas em gel de sílica (PPGS) e fase móvel o sistema de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26) e reveladas com vanilina clorídrica. As 17 frações foram reunidas por semelhança de coloração (fração alcalóide). A fração de alcalóides obtida foi rotaevaporada e posteriormente utilizada para atividade antitumoral.

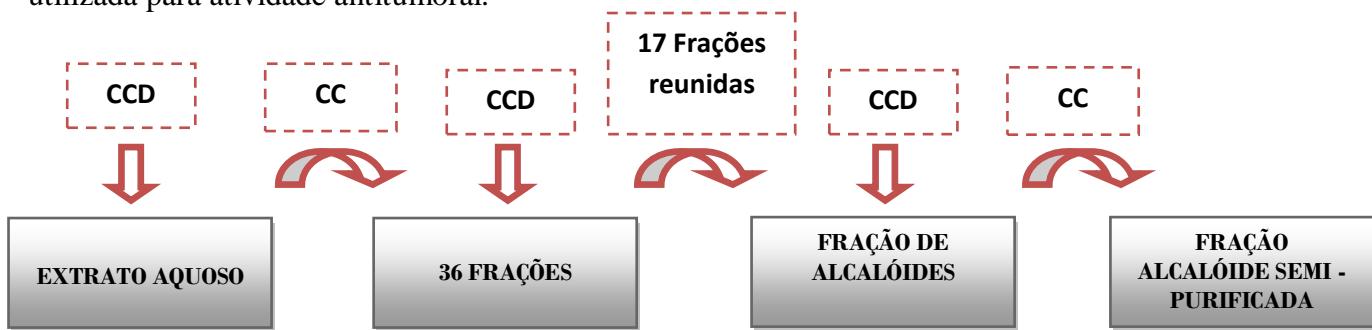


Figura 4. Representação esquemática da obtenção da fração de alcalóides de folhas de *I. suffruticosa*

4.7. Estudo da atividade antitumoral em camundongos portadores de sarcoma 180.

4.7.1. Avaliação da fração de alcalóides de folhas de *I. suffruticosa* após o tratamento sub-crônico em camundongos.

O sarcoma 180 foi obtido do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE/Brasil e mantido dentro do protocolo estabelecido da Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos de acordo com Geran et al. (1972). Para os experimentos foram utilizados camundongos albinos suíços machos divididos em 3 grupos de 6 animais: G1 (animais portadores de sarcoma 180/ Salina), G2 (animais sem sarcoma 180) e G3 (animais portadores de sarcoma 180/Fração de alcalóides). Estes foram pesados, agrupados em gaiolas separadas devidamente etiquetadas e mantidos no Biotério.

As células tumorais foram aspiradas sete dias após sua inoculação em camundongos albinos suíços saudáveis e centrifugadas (70 rpm, por 5min, a 4°C). De acordo com a contagem, a concentração de células viáveis era ajustada com solução de NaCl estéril, tamponada (PBS), para 3×10^6 células por ml. O volume de 0,3 ml foi inoculado por via subcutânea (sc) na região axilar

direita de cada camundongo dos grupos experimentais (G1 e G3) (SHIRAI, IZUMI e YAMAGAMI, 1991). O tempo decorrido entre a remoção do tumor do animal doador até seu implante nos animais receptores, não ultrapassou 60 minutos, conforme recomendado (GERAN et al., 1972). Após 48h do implante a quimioterapia foi iniciada por via intraperitoneal (ip.), mediante administração da fração de alcalóides de folhas de *I. suffruticosa* na dose de 25 mg/kg ip. (Grupo G3) durante sete dias consecutivos. A dose administrada aos animais foi definida baseando-se na DL₅₀ (LEITE, 2003). O veículo salino foi administrado nos grupo controles (G1 e G2) na dose de 14ml/kg ip.

No oitavo dia do experimento, os camundongos foram pesados e eutanasiados por deslocamento cervical para avaliação da atividade antitumoral (STOCK et al., 1955).

Após incisão na pele de cada camundongo, o tumor foi removido e transportado para uma placa de Petri esterilizada, contendo solução de garamicina, a uma concentração de 2 mg/100mL de NaCl 0,9 % (p/v) (GERAN et al., 1972). Os fragmentos de fígado foram removidos e fixados em BOIN sendo o volume de fixador 10 vezes maior que o volume do fragmento. A fixação ocorreu em temperatura ambiente durante 24 horas (MASSON, 1956)

A inibição tumoral foi calculada segundo a fórmula abaixo. A relação T/C deve ser considerada como atividade significativa da droga, correspondendo a uma inibição de 58% (GERAN et al., 1972).

$$TWI\% = \frac{C - T}{C} \times 100, \text{ onde}$$

$$C$$

TWI% = Percentual de inibição do peso tumoral

C = Média do peso dos tumores do grupo controle

T = Média do peso dos tumores do grupo tratado

4.7.2. Estudo histológico e morfométrico do fígado dos camundongos.

Os estudos das alterações histológicas do fígado sob a ação da fração de alcalóides de folhas de *I. suffruticosa* nos grupos G1 (animais portadores de sarcoma 180/ Salina), G2 (animais sem sarcoma 180) e G3 (animais portadores de sarcoma 180/fração de alcalóides) foram realizados por microscopia ótica. Após o período de fixação descrito anteriormente, os fragmentos do fígado foram transferidos para álcool etílico a 70%. Em seguida, os fragmentos foram submetidos a uma ordem crescente de desidratação em álcool, e depois diafanisados em xilol, impregnado e incluído em parafina, segundo metodologia de Masson (1956). Após montagem dos blocos, os mesmos foram submetidos à microtomia, onde cerca de 50 cortes foram realizados, com aproximadamente 50 µm de espessura. Destes, retiraram-se aleatoriamente alguns cortes que foram colocados em lâminas de vidro previamente untadas com albumina de MAYER, e mantidas em estufas durante 30 minutos a 58° C para retirada do excesso de parafina e secagem das preparações histológicas. Após esse período, as preparações histológicas foram submetidas à técnica de coloração com hematoxilina-eosina (H.E.), segundo metodologia de Masson (1956). Um total de 30 preparações histológicas foram observadas através da análise de quatro campos aleatórios. Para observação histológica do fígado e análise morfométrica dos diâmetros dos sinusóides hepáticos, as preparações histológicas foram avaliadas em microscópio Invertido (Leica mod. CBB) e a imagens capturadas com auxílio da câmera Leica conectada a um computador (PC-PENTIUM II-200MHZ), tendo instalada uma placa de captura de imagem e software para morfometria SCION.

4.8. Análise estatística

Os parâmetros tumorais foram analisados utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) seguidos de Kruskal-Wallis onde $p < 0.001$. Atividade do sarcoma 180 foram expressas em Mediana (min-max).

Os resultados da Análise morfométrica dos diâmetros dos capilares sinusóides hepáticos foram analisados por uma análise de variância usando o teste de Tukey ($P < 0,001$).

5. RESULTADOS

5.1. Ensaio fitoquímico da *I. suffruticosa*

5.1.1. Screening fitoquímico

O resultado do screening fitoquímico obtido a partir de extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* encontra-se expresso na Tabela 2. Esses extratos foram investigados com base em técnicas de cromatografia de camada delgada (CCD) que permitem detectar ausência e presença das classes de compostos químicos. O cromatograma do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* constatou a presença de alcalóides e seus derivados bis-indólicos: Indican, Índigo e Indirubina. A presença do alcalóide Indican é abundantemente notada nas folhas, apresentando três bandas marrons (figura 5). O Índigo mostrou-se presente na banda azul (figura 6) (A), Indirubina na banda rosa (figura 6) (B) e foi utilizado como padrão (figura 6) (P) o Indican.

Tabela 2- Metabólitos do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*.

Metabólitos	Folhas <i>I. suffruticosa</i>
Alcalóides	+++
Indican	++
Índigo e Indirubina	+

Expressão dos resultados: (++) = fortemente positivo; (++) = positivo; (+) = fracamente positivo.

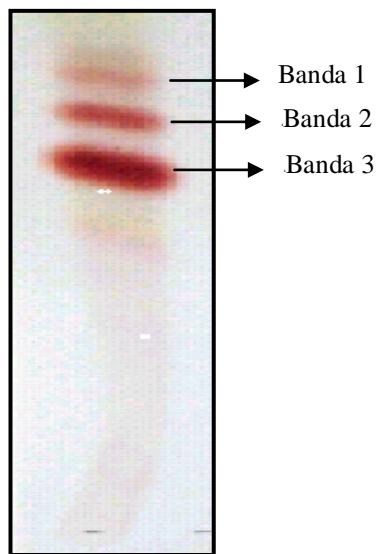


Figura 5. Cromatograma do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* mostrando a Fração de alcaloides (Indican) (3 bandas)

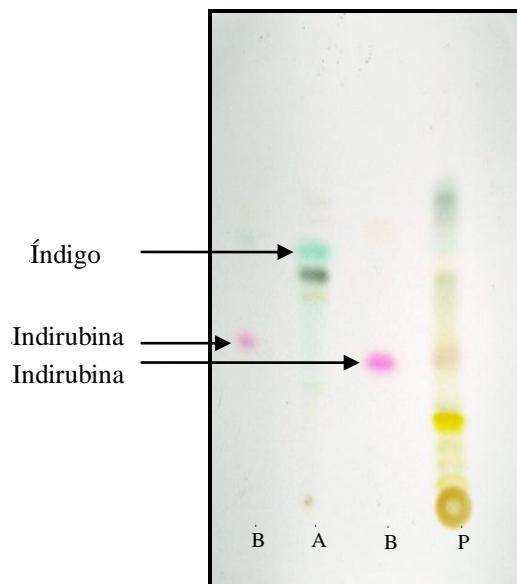


Figura 6 - Cromatograma do extrato aquoso mostrando Índigo (A) e Indirubina (B) de folhas de *I. suffruticosa*. P: Padrão Indican.

5.1.2. Influência da temperatura na obtenção dos derivados indigóides de folhas de *I. suffruticosa*.

A figura 7 expressa o cromatograma do extrato aquoso obtido de folhas de *I. suffruticosa* armazenadas em diferentes temperaturas (temperatura ambiente e 5°C) durante 4 dias. Folhas de *I. suffruticosa* armazenadas na temperatura de 5°C revelaram a presença do índigo e da indirubina (Linha 1) e na temperatura ambiente ausência de derivados indigóides (Linha 2)

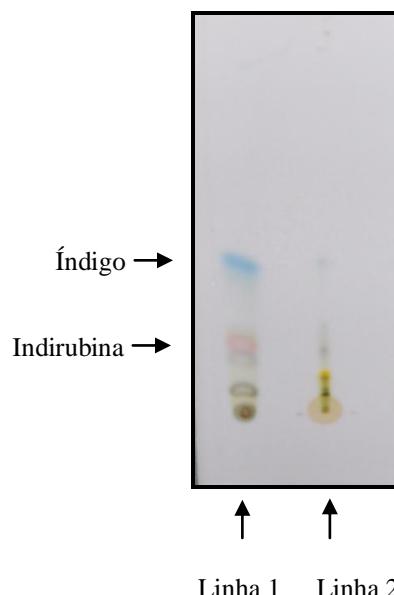


Figura 7. Derivados indigóides obtidos de folhas de *I. suffruticosa* armazenadas em diferentes temperaturas. Na 1^a linha - extrato aquoso de folhas em 5°C (presença do Índigo e Indirubina) e 2^a linha - extrato aquoso de folhas à temperatura ambiente (ausência do Índigo e Indirubina).

5.1.3. Cinética de hidrólise de extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*.

A figura 8 representa o cromatograma de 3 alíquotas do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* submetidas à hidrólise ácida e degradação térmica a 100°C durante 10min (A), 20min (B) e 30min (C). O extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* revelou em A as menores bandas do alcalóide Indican. Em B foram notadas as maiores bandas e em C ausência das bandas do Indican.



Figura 8. Cromatograma do alcalóide Indican durante o processo de hidrólise do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* A -10min/menores bandas; B- 20min/ maiores bandas; C- 30min/ ausência de bandas).

5.2. Extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*.

O extrato aquoso obtido de folhas (1,5 Kg) de *I. suffruticosa* armazenadas a 5°C, apresentou um rendimento de 4g. O cromatograma do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* revelou a presença de alcalóides.

5.3. Fração de alcalóides de folhas de *I. suffruticosa*.

O extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* foi submetido a CC onde foram coletadas 36 frações monitoradas por CCD e constatou-se a presença de alcalóides em 17 destas (12- 28). Posteriormente as frações foram reunidas sendo denominada fração alcaloide apresentando um rendimento de 310 mg.

5.4. Estudo da atividade antitumoral em camundongos portadores de sarcoma 180

5.4.1. Efeito do tratamento sub-crônico da fração de alcalóides de folhas de *I. suffruticosa* em camundongos

O aspecto geral dos tumores Sarcoma 180 de camundongos após sete dias de tratamento com a Fração de alcalóides encontra-se registrado na figura 9 enquanto que o efeito da fração de

alcalóides de folhas de *I. Suffruticosa* em camundongos portadores de sarcoma 180 está registrado na Figura 10. Com relação ao aspecto geral dos tumores do grupo tratado com a Fração de alcalóides foi observado que se apresentaram bastante reduzidos em dois camundongos. (Figura 9 - G3).

O Grupo G3 na dose de 25 mg/kg via i.p. reduziu o peso do Sarcoma 180 em camundongos ($3,30 \pm 0,22$) em relação ao peso do tumor do grupo controle - solução salina (15 ml / ip, kg) ($3,93 \pm 1,79$) (Grupo G1). A fração de alcalóides apresentou inibição tumoral (38,1%) de forma não significativa ($p < 0,001$) quando comparado com a salina que apresentou desenvolvimento tumoral de 100 %.

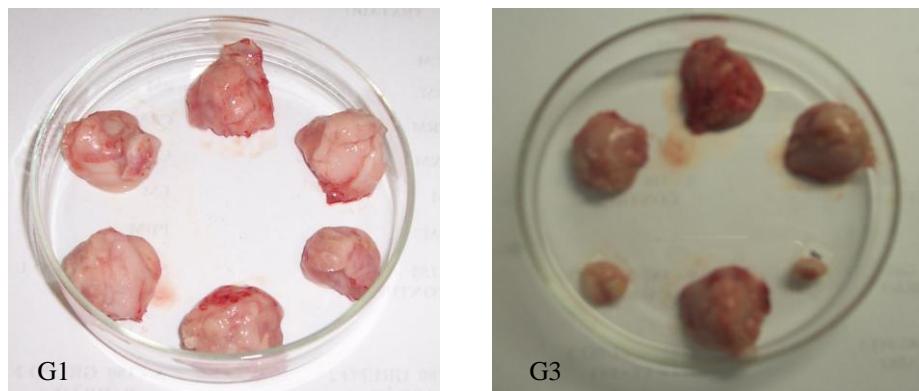


Figura 9: Aspecto geral dos tumores (Sarcoma 180) após sete dias de tratamento. G1- Sarcoma 180 com salina; G3- Sarcoma 180/ Fração de alcalóides.

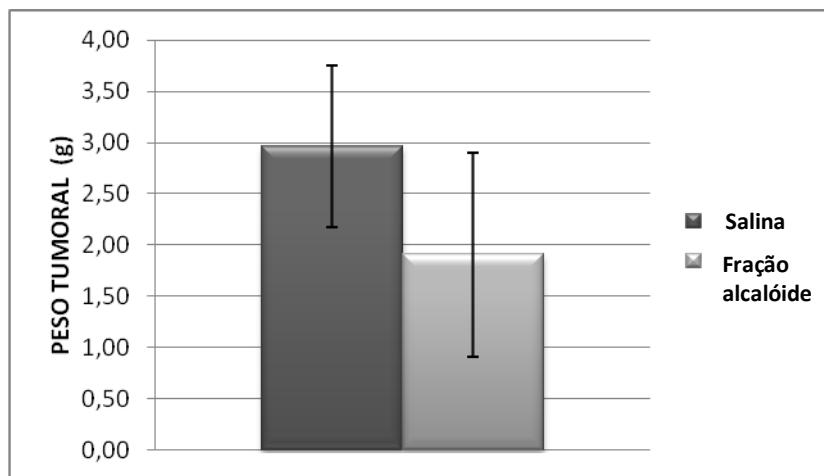


Figura 10. Efeito do tratamento sub-crônico da fração de alcalóides bis-indólicos de folhas de *I. suffruticosa* em camundongos albinos suíços portadores de Sarcoma 180. Os dados estão expressos como média \pm SD. N =12. * p = 0,129. O grupo G3 foi comparado com o grupo G1.

5.4.2. Estudo histológico e morfométrico do fígado de camundongos

A análise histológica do fígado de camundongos portadores de sarcoma 180 após o tratamento sub-crônico com a fração de alcalóides de folhas *I. suffruticosa* na dose de 25 mg/kg i.p. e dos camundongos sem sarcoma 180/ salina (15 ml /kg) i.p., mostraram uma arquitetura normal do tecido hepático; cordões de hepatócitos (CH) muito bem arranjados, capilares sinusóides (S) e veias centrais (VC) sem alterações (Figura 11 A e 11 B) comparados com os camundongos portadores de sarcoma 180/salina que mostrou congestão hepática; alterações nos cordões de hepatócitos (CH *), capilares sinusóides (S) e veias centrais distendidas (VC) (Figura 11 C)

A morfometria dos diâmetros dos capilares sinusóides hepáticos dos camundongos portadores de sarcoma 180 submetido ao tratamento sub-crônico com a fração de alcalóides de folhas de *I. suffruticosa* na dose 25 mg/kg i.p. (0.087 ± 0.025) foi similar aos capilares dos camundongos sem Sarcoma 180/salina (0.085 ± 0.010) quando comparados com os capilares hepáticos dos camundongos portadores de sarcoma 180/Salina que apresentou aumento significativo dos seus diâmentros (4.21 ± 1.033) (Figura 12).

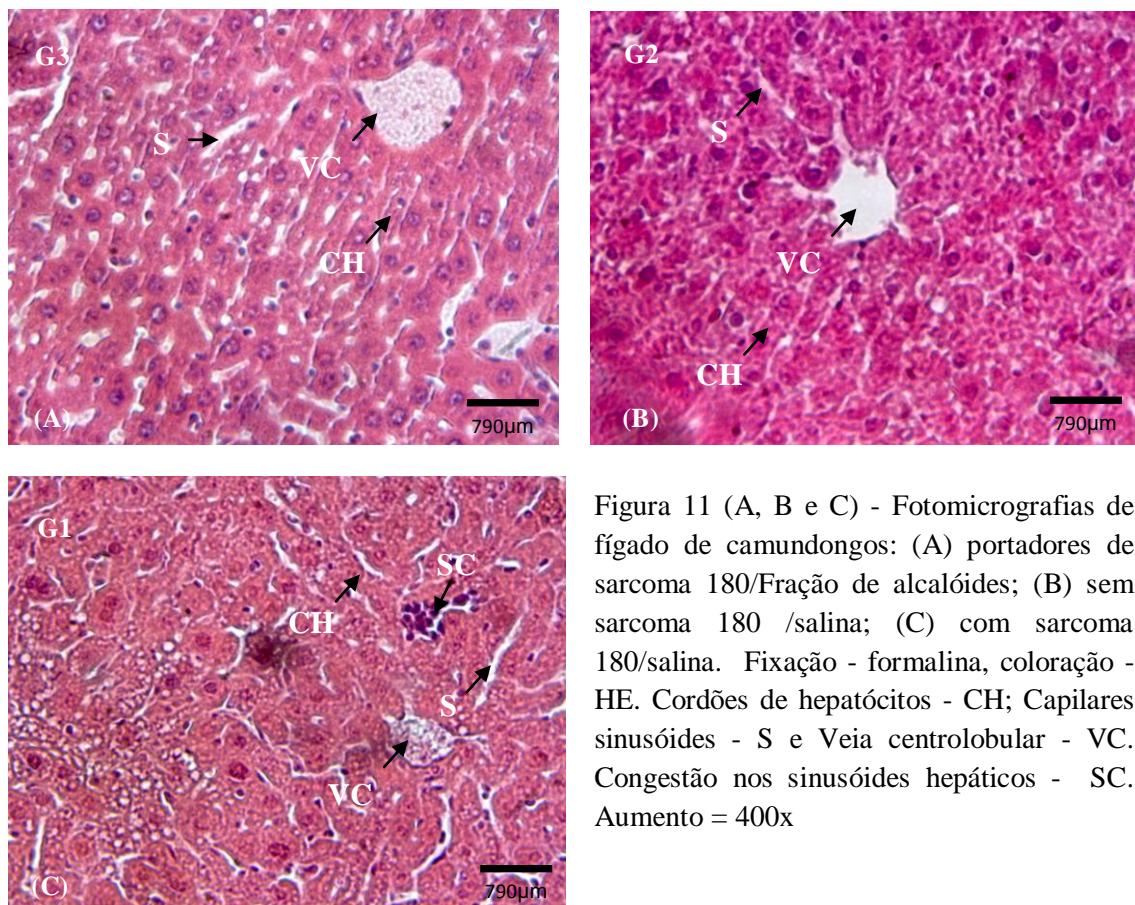


Figura 11 (A, B e C) - Fotomicrografias de fígado de camundongos: (A) portadores de sarcoma 180/Fração de alcalóides; (B) sem sarcoma 180 /salina; (C) com sarcoma 180/salina. Fixação - formalina, coloração - HE. Cordões de hepatócitos - CH; Capilares sinusóides - S e Veia centrolobular - VC. Congestão nos sinusóides hepáticos - SC. Aumento = 400x

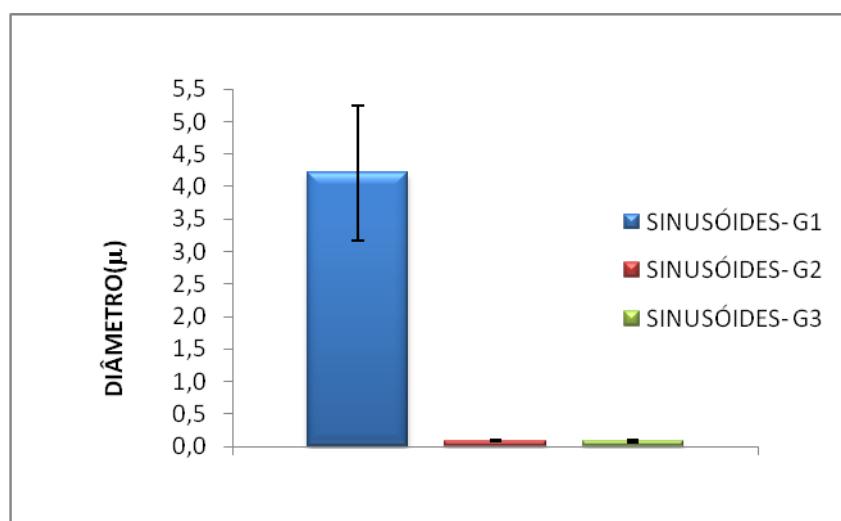


Figura 12. Morfometria dos diâmetros dos capilares sinusóides hepáticos de camundongos: Sinusóides-G1 (portadores de sarcoma 180/Salina); Sinusóides- G2 (sem sarcoma 180 /salina) e sinusóides G3 (com sarcoma 180/Fração de alcalóides). Os dados estão expressos em análise de variância usando o teste de Tukey ($P < 0,001$). N - 30

6. DISCUSSĀO

Dentre as classes de compostos químicos encontrados em plantas está a dos alcalóides. Estima-se que esta classe abranja mais de 4.000 compostos e que está dividida em diferentes grupos com destaque para o grupo dos alcalóides indólicos, devido à sua grande diversidade em termos de estrutura e de propriedades farmacológicas (CORDELL et al., 2001; VERPOORTE, 1986).

Indigóides pertencem à classe de alcalóides bis-indólicos e são produtos naturais que têm uma longa história em razão do uso como tinturas (ENSLEY et al., 1983). Em plantas esses pigmentos são característicos das espécies *Indigofera* (África, Ásia, América do Sul), *Polygonum tinctorium* (China e Coréia) e *Isatis tinctoria* (Europa) (MAUGARD et al., 2001). Schunck em 1855 descreveu um componente que nomeou Indican, o qual considerou o precursor do Índigo extraído da *Indigofera sp.* e *Polygonum tinctorium* Ait. Em 1900, Hoogewerff e Meulen estabeleceram sua estrutura como indoxyl -glucoside (HURRY, 1930).

O estudo fitoquímico do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* mostrou a presença de alcalóides e derivados bis-indólicos: Índigo, Indirubina e bandas de Indican que podem corresponder a esse derivado. A presença de derivados indigóides em nossos estudos corroboram com os resultados de Leite (2003) que realizou um estudo fitoquímico nas diferentes partes da *I. suffruticosa* e verificou a presença do Índigo. Recentemente esses indigóides foram identificados nas folhas desta espécie (VIEIRA, 2011).

Processos extractivos em folhas de *I. suffruticosa* foram realizados na obtenção da Fração de alcalóides. Em condições normais, o processo de extração em si baseia-se na remoção ou separação de um componente de um sistema em contato com outro material ou fase que tem uma maior afinidade por ele. (KIRK et al 1993).

A determinação das condições de extração é realizada com o objetivo de se obter uma maior quantidade possível do componente a ser isolado. Em nosso estudo foram determinadas condições para obtenção do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*: a influência de diferentes temperaturas

no processo de armazenamento das folhas e a cinética de hidrólise do extrato para obtenção de derivados indigóides.

O cromatograma das folhas armazenadas na temperatura de 5°C revelou a presença de bandas de Índigo e Indirubina e ausência destas bandas a temperatura ambiente. Nossos resultados são similares aos estudos de Vieira (2011) que realizou nas mesmas condições o armazenamento de folhas desta espécie na obtenção de extrato metanólico. O resultado da cinética de hidrólise mostrou uma degradação térmica em que as maiores bandas do Indican reveladas, foram no tempo de 20 minutos, por outro lado com 10 e 30 minutos as bandas do Indican se apresentaram menores e ausentes respectivamente. Trabalhos recentes realizados com cinética de hidrólise a partir de extrato metanólico de *I. suffruticosa* apresentaram resultados semelhantes (VIEIRA, 2011). Diferentes trabalhos de investigação têm abordado o efeito destas condições sobre o rendimento de corantes em *Isatis tinctoria* e *Polygonum tinctorium* (BECHTOLD et al., 2002; MATADAMAS-ORTIZ, 2002).

A literatura relata inúmeros estudos farmacológicos envolvendo alcalóides bis-indólicos, principalmente derivados da Indirubina: atividades anti-cancerígena (NAM et al., 2005), leishmanicida (GRANT et al., 2004), antiproliferativa (ADACHI et al., 2004) antiinflamatória (IWAKI & KURIMOTO, 2002), antioxidante (BEUTNER et al., 2001), antimicrobiana (MACNEIL et al., 2001), antimitótica (DAMIENS et al., 2001), fungicida (MARERO et al., 1997), estudos genéticos (ADACHI et al., 2004) e tratamento da doença de Alzheimer (POLYCHRONOPOULOS et al., 2004).

Apesar da existência de inúmeros produtos farmacêuticos, naturais ou sintéticos, que são utilizados no tratamento do câncer, as particularidades biológicas inerentes a cada tipo de tumor, juntamente com a resistência às drogas quimioterápicas que as células tumorais podem desenvolver, impulsiona a busca de novos produtos com atividade antineoplásica (O'PESSOA, 1992). Este estudo teve como um de seus objetivos verificar a atividade antitumoral da Fração de alcalóides obtida das folhas da *I. suffruticosa*.

A Fração de alcalóides na concentração de 25mg/Kg ip. apresentou inibição tumoral (38,1%) de forma não significativa quando comparada com a salina que apresentou desenvolvimento tumoral de 100%. Por outro lado o tamanho de alguns tumores (Sarcoma 180) tratados com a Fração de alcalóides se apresentaram bastante reduzidos. Trabalhos reportando o estudo da atividade antitumoral utilizando a fração de alcalóides não foram encontrados na literatura, o que dificulta comparar os resultados obtidos com outros nas mesmas condições. Vieira., et al (2007) utilizando extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* obtidos por infusão e maceração na concentração de 50mg/Kg ip. constatou atividade antitumoral *in vivo* sob sarcoma 180. Esse fato pode estar relacionado à presença de outros princípios ativos no extrato bruto que devem estar atuando de forma sinérgica para desencadear a atividade antitumoral ou devido a Fração de alcalóides apresentar pouca absorção e solubilidade interferindo diretamente em seus efeitos.

Estudos das reações comportamentais durante a aplicação de tratamento em animais utilizando determinada droga são comuns. A observação das reações comportamentais dos camundongos durante tratamento subcrônico com a Fração de alcalóides na dose de 25 mg/kg, foram reações de fuga, excitação, piloereção, espasmos musculares e contorções abdominais. Efeitos similares foram observados em estudos realizados por Leite (2003) que demonstrou que o extrato aquoso de *I. suffruticosa* provocou nas doses de 50, 150, 300 e 600mg/Kg reações comportamentais estimulantes e depressoras. Vieira (2007) utilizando extrato aquoso de *I. suffruticosa* por infusão e maceração na dose de 50 mg/Kg também observou reações comportamentais semelhantes a este estudo. Devido a ensaios toxicológicos realizados com *I. suffruticosa* esta planta pode ser considerada praticamente atóxica visto que a DL₅₀ não pôde ser determinada, pois o extrato aquoso de folhas nas diferentes doses de 50 a 2.000mg/kg i.p. não provocou índice de mortalidade em camundongos albinos suíços durante 72hs de observação, sugerindo baixa ordem de toxicidade (LEITE et al., 2006).

Observações histológicas são importantes ferramentas para detectar mudanças histofisiológicas no fígado causadas por compostos bioativos. O fígado é um órgão de suma importância e desempenha um papel importante no metabolismo e detoxificação de toxinas exógenas e agentes terapêuticos. (RAM, 2001; SETTY et.al., 2007; KUPPUSWAMY et.al., 2003).

A análise histológica e morfométrica revelou que não houve alteração estrutural no epitélio do fígado de camundongos com sarcoma 180 após o tratamento sub-crônico com a Fração alcalóide e sem sarcoma 180/salina, entretanto no controle com sarcoma 180/salina foram observadas alterações significativas no fígado: congestão hepática, alterações nos cordões de hepatócitos e distensão nos capilares sinusoides e veias centrais.

A eficácia de qualquer droga hepatoprotetora é essencialmente dependente da sua capacidade em reduzir os efeitos nocivos ou de manutenção da fisiologia normal hepática que foi perturbada por uma hepatotoxina. (ROY et al, 2006).

Renteria et al (2007) em estudos da análise histológica do fígado de ratos intoxicados com CCl₄ e tratados com extrato metanólico de *Leucophyllum frutescens* (100 mg / kg ou 200 mg / kg) observou destruição pouco acentuada da arquitetura do fígado, ausência de fibrose e inflamação moderada quando comparados com o fígado de ratos intoxicados com CCl₄ sem tratamento que apresentaram acumulação extensiva de tecido conjuntivo resultando na formação contínua de fibrose septal, nódulos de regeneração, alterações gordurosas, alterações perceptíveis na veia centrolobular e inflamação acentuada, sugerindo que o extrato metanólico de *Leucophyllum frutescens* apresenta efeito hepatoprotetor (RENTERIA et al., 2007).

Estudos similares utilizando extrato etanólico de *Adenema hyssopifolium* mostraram que esta planta contém substâncias farmacologicamente ativas com propriedades hepatoprotetoras fornecendo a justificativa para o uso de *Adenema hyssopifolium* em doenças do fígado por tradicionais curandeiros na Índia (RAJASEKARAN, 2010). Venkumar et al (2002) em estudos

para analisar o efeito hepatoprotetor do extrato metanólico de rizomas de *Curculigo orchoides* onde foi detectada a presença de alcalóides sugeriram que o extrato neutralizou o efeito tóxico do CCl₄ e ajudou na regeneração dos hepatócitos.

No entanto, Silva (2006) em estudos utilizando extrato aquoso da casca do caule de *Dioclea grandiflora*, durante 7 dias, mostraram alterações significativas nos núcleos de hepatócitos quando comparados com o controle. A principal alteração observada foi o aumento do núcleo referente a área, diâmetro, perímetro e volume. Maruo (2002) em estudos utilizando os frutos de *Solanum lycocarpum* na alimentação de fêmeas de ratos e Pípole (2010) utilizando o resíduo aquoso final da *Ipomoea carnea* na dose de 7 g/Kg, através de análises histológicas observaram uma congestão hepática nos animais sugerindo um efeito hepatotóxico destas plantas.

O estudo do efeito da Fração alcalóide de folhas de *I. suffruticosa* mostrou resultados relevantes principalmente quanto análise histológica e morfométrica do tecido hepático. O resultado desse estudo demonstrou uma proteção eficaz no fígado dos camundongos portadores de sarcoma 180. Essa condição sugere a caracterização de componentes da Fração alcalóide e investigação de suas atividades biológicas como um meio alternativo de proteção ou manutenção da fisiologia normal do fígado ou de outros órgãos. Esta é uma planta promissora em estudos para o desenvolvimento de drogas.

7. CONCLUSÕES

A Fração alcalóide isolada foi obtida do extrato aquoso das folhas de *I. suffruticosa*.

O tratamento sub-crônico com a Fração alcalóide isolada de folhas *I. suffruticosa* não reduziu significativamente o peso médio do tumor Sarcoma 180 na dose de 25mg/Kg por via i.p quando comparada ao grupo controle.

A análise histológica e morfometrica do tecido hepatico de camundongos portadores de sarcoma 180 após o tratamento sub-crônico com a Fração alcalóide isolada de folhas *I. suffruticosa* na dose de 25 mg/kg i.p. preservou a arquitetura do tecido hepático e os diâmetros dos capilares sinusóides.

8. PERSPECTIVAS

Avaliar a atividade toxicológica e analisar as reações comportamentais dos camundongos sobre tratamento subcrônico com a fração alcalóide.

Investigar a atividade hepatoprotetora e realizar o estudo histomorfométrico do tecido hepático de camundongos submetidos ao tratamento subcrônico com a fração alcalóide.

REFERÊNCIAS

- ADACHI, J.; MORI, Y.; MATSUI, S.; MATSUDA, T. Comparison of Gene Expression Patterns between 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and a Natural Arylhydrocarbon Receptor Ligand, Indirubin. **Toxicological Sciences**, v. 80, p.161-169. 2004.
- AGUS, D.B. et al. Response of prostate cancer to anti Her-2/neu antibody in androgen-dependent agent and independent human xenograft models. **Cancer Research**, v.59, n.19, p.4761-4, 1999.
- ALLEN, O.N.; ALLEN, E. Leguminosae: source book of Characteristics, uses and nodulation. Washington: **The University of Wisconsin Press**, p. 813. 1981.
- ALTMANN, K. H.; GERTSCH, J.; **Nat. Prod. Rep.** 2007, 24, 327.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, D. A. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 28, p. 431-441. 2005.
- BARROS,G.M.C.C.; TEIXEIRA, S.P. Estudo farmacobotânico de duas espécies de Anileira (*Indigofera suffruticosa* e *Indigofera truxillensis*, Leguminosae) com propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia.**, v.18, n.2, p.287-294. 2008
- BECHTOLD, T.; TURCANU, A.; GEISSLER, S.; GANGLBURGER, E. Process balance and product quality in the production of natural índigo from *Polygonum tinctorium* Ait. Applying low-technology methods. **Bioresour. Technol.**, v. 81, p. 171 – 177. 2002.
- BEUTNER, S.; BLOEDORN, B.; FRIXEL, S.; BLANCO, I. H.; HOFFMANN, T.; MARTIN, H. D.; MAYER, B.; NOACK, P.; RUCK, C.; SCHMIDT, M.; SCHULKE, I.; SELL, S.; ERNST, H.; HAREMZA, S.; SEYBOLD, G.; SIES, H.; STAHL, W.; WALSH, R. Quantitative assessment of antioxidant properties of natural colorants and phytochemicals: carotenoids, flavonoids, phenols and indigoids. The role of b-carotene in antioxidant functions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 6, p. 559-568. 2001.
- BORSCHERS, A. T.; KEEN, L. C.; GERSHWIN, M. E. Mushrooms, tumors and immunity: an update. **Exp Biol Med**, v. 229, p. 393-406. 2004.
- BRAGA, R. **Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará**. 3^a edição. Mossoró: Escola Superior de Agricultura, p.452. 1976.
- BRAMWELL, D. How many plant species are there? **Plant Talk**, Wiltshire, v. 28, p. 32. 2000.
- BRASIL.INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da saúde. 2010. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 03 agosto. 2011.
- BRASIL.INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da saúde. 2003. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 05 julho.2005.
- BRASIL.INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da saúde. 2008. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 10 junho. 2010.
- BRASIL.INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Ministério da saúde. 2009. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 03 agosto. 2011.

BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004.

BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000.

BUBENÍK, J.; VONKA, V. MHC class I status of tumours and design of immunotherapeutic strategies. **Immunol. Lett.**, v. 90, p. 177-178. 2003.

CALIXTO, J. B. et al. Design of Potent Non-Peptide Competitive Antagonists of the Human Bradikinin B2 Receptor. **Journal of Medicinal Chemistry**. In Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research; R.M. Burch, Marcel Dekker Inc. New York, v.36, p. 88, 1990.

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

CALVO, T.R. et al. Mutagenic Activity of Indigofera truxillensis and I. suffruticosa Aerial Parts. **eCAM**, vol.2011, 9 pag. 2009.

CARVALHO, A.C.B et al. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia** , n.11, p.26-32. 2007.

CECHINEL FILHO, V. YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização de atividade. **Quim. Nova**, v.21, n.1, p.99-105. 1998.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 183-205. 2001.

CORMACK, D. H. **Fundamentos de histologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 371. 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Discovery and development of antineoplastic agents from natural sources. **Cancer Investigation**, v.17, n. 2, p.153-163. 1999.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, p. 595-598. 1981.

DAMIENS, E.; BARATTE, B.; MARIE, D.; EISENBRAND, G.; MEIJER, L. Anti-mitotic properties of indirubin- 3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest. **Oncogene**, v. 20, n. 29, p. 3786-3797. 2001.

DREWS, J. Drug discovery: a historical perspective. **Science**, London, v. 287, n. 5460, p. 1960-1964. 2000.

ENSLEY, B. D.; RATZKIN, B. J.; OSSLUND, T. D.; SIMON, M. J.; WACKETT, L. P.; GIBSON, D. T. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. **Science**, v. 222, p.167-169. 1983.

FARNSWORTH, N.R.; KAAS, C. J. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. **J. Ethnopharmacol**, v.3, p.85.1981.

FILARDI, F.L.R. **Espécies lenhosas de Leguminosae na estação ambiental de Volta Grande.** Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Minas Gerais: Universidade Federal de Viçosa. 2005.

GARCIA-MACIAS, P.; JOHN, P. Formation of natural indigo derived from Woad (*Isatis tinctoria* L.) in relation to product purity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7891-7896. 2004.

GARTNER, L. P.; HIAT, L. P. **Tratado de histologia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 456. 2003.

GERAN, R.I. et al. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal and other biological systems. **Cancer Chemotherapy Reports**, v.3, n.2, p.208-209. 1972.

GILLAM, E. M. J.; NOTLEY, L. M.; CAI, H.; DE VOSS, J. J.; GUENGERICH, F. P. Oxidation of indole by cytochrome P450 enzymes. **Biochemistry**, v. 39, p. 13817-13824. 2000.

GRANT, K. M.; DUNION, M. H.; YARDLEY, V.; SKALTOUNIS, A-L.; MARKO, D.; EISENBRAND, G.; CROFT, S. L.; MEIJER, L.; MOTTRAM, J. C. Inhibitors of Leishmania mexicana CRK3 cyclin-dependent kinase: chemical library screen and antileishmanial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3033-3042. 2004.

GURBUZ, I.; USTUN, O.; YESILADA, E.; SEZIK, E.; AKYUREK, N. In vivo gastroprotective effects of five Turkish folk remedies agaisnt ethanol-induced lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, n.3, p. 241-244. 2002.

GUSTINE, D.L. Aliphatic nitro compounds in crownvitch: A review. **Grop Sci**, v.19, n.2, p.197-203. 1979.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 973. 2002.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v.5, p.294-300. 2000.

HASTINGS, R. B. Medicinal Legumes of Mexico: Fabaceae, Papilonoideae, Part One. **Economic Botany**, v. 44, n.3, p. 336-348.1990.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol**, v.32, p.1141. 1983.

HIB, J. **Di Fiore Histologia. Texto e Atlas.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 513. 2003.

HOSOE, T.; NOZAWA, K.; KAWAHARA, N.; FUKUSIMA, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; KAWAI, K. Isolation of a new potent cytotoxic pigment along with indigotin from the pathogenic basidiomycetous fungus *Schizophyllum commune*. **Mycopathologia**, v. 146, p. 9-12. 1999.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios Ativos de Plantas Superiores, São Carlos: Ed UFSCAR, p. 7-42. 2003.

HURRY, J.B The Woad Plant and its Dye. Oxford Univ. Press, Oxford. 1930.

ISLAM, I.; BROWN, G.; BRYANT, J.; HRVATIN, P.; KOCHANNY, M. J.; PHILIPS, G. B.; YUAN, S.; ADLER, M.; WHITLOW, M.; LENTZ, D.; POLOKOFF, M. A.; WU, J.; SHEN, J.; WALTERS, J.; HO, E.; SUBRAMANUAM, B.; ZHU, D.; FELDMAN, R. I.; ARNAIZ, D. O. Indolinone based phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) inhibitors. Part 2: optimization of BX-517. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 3819-3825. 2007.

IWAKI, K.; KURIMOTO, M. Cancer preventive effects of the indigo plant, *Polygonum tinctorium*. **Recent Research Developments in Cancer**, v. 4, p. 429-437. 2002.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. Plant Systematics: a phylogenetic approach. 2 ed. Massachusetts: Sinauer Associates. 1999.

JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528. 2005.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 488. 2004.

KAMAL, R.; MANGLA, M. *In vivo In vitro*, Investigation on retenoids from *Indigofera suffruticosa* and their biofficacy against the larvae of *Anopheles stephensi* and adults of *Callosobruchus chinesis*. **J Biosc.**, v.18, n.1, p.93-110.1993.

KARBER G, BEHRENS B. **Statistical methods in biological assays**. Londres: Griffin Ch. An. C, 1964, apud Silva, ECB. **Avaliação biológica de Caesalpinia echinata Lam. - Fabaceae/Caesalpinoideae - usos e riscos**. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – UFPE. 2006.

KAWAKUBO, Y. Histopathological studies on antitumor effect of sporamycin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 5, p. 113-118. 1980.

KING, J. **Enzimología Clínica Practica**. Editorial Acribia: Zaragoza – Espanha. 1968.

Kirk, G.J.D., C.B.M. Begg y J.L. Solivas. The chemistry of the lowland rice rhizosphere. **Plant Soil** 155/156: 83-86.1993.

KO, E. C.; WANG, X.; FERRONE, S. Immunotherapy of malignant diseases. Challenges and strategies. **Int. Arch. Allergy Immunol.** v. 132, p. 294-309. 2003.

KUMAR, V. & COTRAN, R. **Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2000.

LEITE, S.P et al, “Anti-inflammatory activity of *Indigofera suffruticosa* extract,” **Revbrasa**, vol. 7, pp. 47–52. 2003.

LEITE, S.P. *Indigofera Suffruticosa Mill: ensaio fitoquímico e ações biológicas*. Tese (Doutorado em produtos naturais). João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba. 2003.

LEITE, S.P et al “Embryotoxicity in vitro with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves,” **Reproductive Toxicology**, vol. 18, no. 5, pp. 701–705. 2004.

LEITE, S.P; VIEIRA, J. R. C; LEITE, R. M. P. "Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 261–265. 2006.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B. & LOCK, M. **Legumes of the world. Royal Botanic Gardens**, Kew. 578p. 2005.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D. Leguminosae or Fabaceae? In: KLITGAARD, B.B.; BRUNEAU, A. (Eds). Advances in legume systematic – Part 10. Kew: Royal Botanical Gardens, v.10, p.1-3. 2003.

LÓPEZ, C. A. A. **Considerações gerais sobre plantas medicinais.** Ambiente: Gestão e Desenvolvimento, 1(1):19-27. 2006

LOUIS, S.; DELOBEL, B.; GRESSENT, F.; DUPORT, G.; DIOL, O.; RAHIOUI, I.; CHARLES, H.; RAHBÉ, Y. Broad screening of the legume family for variability in seed insecticidal activities and for the occurrence of the A1b-like knottin peptide entomotoxins. **Phytochemistry**, v.68, p.521-535. 2007.

MACEWEN, E.G.; ROSENTHAL, R. C. Abordagem do Tratamento dos Pacientes Cancerosos. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, 3ed. São Paulo: Manole, v.1, p.312-326. 1992.

MACNEIL, I. A.; TIONG, C. L.; MINOR, C.; AUGUST, P. R.; GROSSMAN, T. H.; LOIACONO, K. A.; LYNCH, B. A.; PHILLIPS, T.; NARULA, S.; SUNDARAMOORTHI, R.; TYLER, A.; ALDREDGE, T.; LONG, H.; GILMAN, M.; HOLT, D.; OSBURNE, M. S. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 301-308. 2001.

MANN, M.; HOJRUP, P.; ROEPSTORFF P. Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. **Biol MUSS Spec**, vol. 22, p.338-345. 1993.

MARANHĀO, J.B. *Indican, índigo e indirubina de folhas de Indigofera suffruticosa sobre linhagens celulares neoplásicas.* Dissertação (Mestrado em Patologia). Recife: Universidade Federal de Pernambuco. 2008.

MARERO, L. M.; JIN, J. H.; SHIN, J. H.; LEE, H. J.; CHUNG, I. S.; LEE, H. J. Effect of fungal elicitation on indirubin production from a suspension culture of *Polygonum tinctorium*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 97-101. 1997.

MARIZ, S.R. *Estudo Toxicológico pré-clínico de Jatropha gossypiifolia L.* Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos). João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba. 2007.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification.** London: Acad. Pres., p.52-61, 1982.

MARTINEZ M. Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas, México. 1933.

MARTINS E.R, CASTRO D.M, CASTELLANI D.C, DIAS J.E. Plantas medicinais.Viçosa: Editora UFV. 2000

MARUO, V. M. *Estudo dos possíveis efeitos tóxicos á exposição Solanum lycocarpum em ratos adultos e em sua prole.* Tese (Doutorado em patologia experimental e comparada da faculdade de medicina, veterinária e zootecnia). São Paulo: Universidade de São Paulo. 85 p. 2002.

MASSON P. Tumeurs humaines: histologic diagnostics et techniques. 2ed. Paris: Librairie maloine. 1956.

MATADAMAS-ORTÍZ, E.J. Etude et Caractérisation des matières colorantes du pastel (*Isatis tinctoria* L) Determination des conditions optimales d'extraction pour leur utilisation à l'échelle industrielle. These de Docteur de l'Institut polytechnique de Toulouse. Spécialité Sciences des Agroressources. LCA INRA/INP-ENSIACET Toulouse, France. 250 p. 2002.

MATOS, F. J. DE ABREU. **Plantas da Medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas.** Fortaleza: Ed. UFC, p.78. 1999.

MAUGARD, T.; ENAUD, E.; CHOISY, P.; LEGOY, M. D. Identification of an indigo precursor from leaves of *Isatis tinctoria* (Woad). **Phytochemistry**, v. 58, p. 897-904. 2001.

MILLER, R.W.; SMITH, J.R. Seeds of *Indigofera suffruticosa* species: Their content of amino acids that may be deleterious. **J. Agr. Food Chem.**, v.21, n.5, p.909-912. 1973.

MONTELLANO, O. B. Empirical Aztec medicine. **Science**, v.188, p.215. 1975.

MOREIRA, J. L.; AZEVEDO-TOZZI, A. N. G. *Indigofera* L. (Leguminosae) no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, v. 20, n.1, p. 97-117. 1997.

NAM, S.; BUETTNER, R.; TURKSON, J.; KIM, D.; CHENG, J. Q.; MUEHLBEYER, S.; HIPPE, F.; VATTER, S.; MERZ, K-H.; EISENBRAND, G.; JOVE, R. Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. **Biochemistry**, v. 102, n. 17, p. 5998-6003. 2005.

NAPRALERT- Natural Products Alert. Illinois University, Chicago. Disponível em <http://www.uic.edu/pharmacy/depts/PCRPS/NAPRALERT.htm> acesso em Junho de 2003.

NEWMANN, D. J.; CRAGG, G.M.; SNADE, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1022-1037. 2003.

NEWMAN, D. J; CRAGG, M.G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477. 2007.

O'PESSOA, C. Testes "in vivo" e "in vitro" para avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral de plantas do nordeste brasileiro. Dissertação (Mestrado). Ceará: Universidade Federal do Ceará. 1992.

PAIVA, A. M. S.; BARBOSA, A. C. D.; ALVES, H. L. J. *Indigofera suffruticosa* Mill (Leguminosae) com potencial forrageiro em uma região de Caatinga no semi-árido de Pernambuco (Alagoinha). Congresso Nacional de Botânica. São Paulo, v.38, p.422. 1987.

PIO-CORRÊA, M. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura - Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal v. 5: 485. 1984.

PÍPOLE, F. *Avaliação dos efeitos imunotóxicos da Ipomoea carnea e de seu princípio ativo tóxico, a suainsonina, em ratos jovens e adultos.* Dissertação (Mestrado em patologia experimental e comparada da faculdade de medicina, veterinária e zootecnia). São Paulo: Universidade de São Paulo. 2010.

POLHILL, R.M. Classification of the Leguminosae & complete synopsis of legume genera. Edição de: BISBY, F.A.; BUCKINGHAM, J.; HARBORNE, J.B. (Eds.), **Phytochemical dictionary of the Leguminosae**. London: Chapman & Hall. 1994.

POLYCHRONOPOULOS, P.; MAGIATIS, P.; SKALTSOUNIS, A. L.; MYRIANTHOPOULOS, V.; MIKROS, E.; TARRICONE, A.; MUSACCHIO, A.; ROE, S. M.; PEARL, L.; LEOST, M.; GREENGARD, P.; MEIJER, L. Structural basis for the synthesis of indirubins as potent and selective inhibitors of glycogen synthase kinase-3 and cyclin-dependent kinases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 935-946. 2004.

RAM, V.J.; Herbal preparations as a source of hepatoprotective agents. **Drug news perfect**, 14: 353 - 363. 2001.

RAJASEKARAN, A.; ARIVUKKARASU, R.; MURUGESH, S. Hepatoprotective Effect of *Adenema hyssopifolium* G.Don (Gentianaceae) in Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats. College of Engineering and Technology, Vellore, India. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, 9 (2): 157-163. 2010

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603–613. 2001.

RENTERIA IB, CORONA MRC, ROSALES PC, GARZA HGL, NAVA DC, MENDOSA FJA, CANTÚ EMT. Hepatoprotective effect of *Leucophyllum frutescens* on Wistar albino rats intoxicated with carbon tetrachloride. **Ann Hepatol**, 6: 251-4. 2007

RIBEIRO, R. L. A.; BAUTISTA, A. R. P. L.; SILVIA, A. R.; SALES, A. L.; SALVADORI, D. M. F.; MAIA, P. C. Toxicological and Toxicogenetic Effects of Plants used in popular Medicine and in Cattle Food. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.86, n.3, p.89-91. 1991.

ROIG, J.T. Plantas Medicinales, Aromaticas o Venenosas *De Cuba*. Editorial Cientifica-Tecnica, La Havana - Cuba. 164 pp. 1988.

ROUILLER, C. The liver. London: Academic Press, v. 2, p. 335. 1964

ROY, C.K.; KAMATH, J.V.; ASAD, M. Hepatoprotective activity of *Psidium guava* Linn. Leaf extract. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.44, n.4, p.305-311. 2006.

SHARMA, S.V.; HABER, D.A.; SETTLEMAN, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. **Nat Rev Cancer**, v. 10, n. 4, p. 241-253. 2010. SHIRAI, M.; IZUMI, H.; YAMAGAMI, T. Experimental transplantation models of mouse Sarcoma 180 mice for evaluation of antitumour drugs. **Journal of Veterinarian Medical Sciences**, vol.53, n.4, p.707- 713. 1991.

SILVA, L.L.S. *Aspectos morfológicos e morfométricos de hepatócitos de camundongos (*Mus musculus*) tratados com extrato aquoso de *Dioclea grandiflora* (Fabaceae)* Dissertação (Mestrado em Patologia). Recife: Universidade Federal de Pernambuco. 50 p. 2006.

SIMÓES, C.M.O.S et al. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5^a ed. Rio Grande do Sul, Brasil, Editora da UFSC. 2004.

SIMPSON, B.B.; OGORZALY, M.C. **Economic botany: plants in our world**. 3 ed. McGraw-Hill, New York. 2001.

SIQUEIRA, H. M. Importância das plantas medicinais. **Sociologia e Extensão Rural** – UFES, Espírito Santo, p. 1 -4. 2006.

SONDHI, S. M.; DINODIA, M.; KUMAR, A. Synthesis, anti-inflammatory and analgesic activity evaluation of some amidine and hydrazone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 4657-4663. 2006.

SOSULSKI, F.W.; SOSULSKI, K. Legumes: horticulture, properties and processing. Edição de: HUI, Y.H. (Ed.), **Handbook of food science, technology and engineering**. New York, CRC Press, v.1. 2006.

SPRENT, J.I. **Nodulation in Legumes**. Royal Botanic Gardens, Kew. 2001

STANDLEY, P.C. Trees and shrubs of México. *Contr U S Natl Herb*, 1922; 23(2): 429-515.

STOCK, C.C. et al. Sarcoma 180 inhibition screening data. **Cancer Research**, v.2, p.179-331. 1955.

SUN, L.; TRAN, N.; LIANG, C.; TANG, F.; RICE, A.; SCHRECK, R.; WALTZ, K.; SHAWWER, L. K., MCMAHON, G.; TANG, C. Design, synthesis, and evaluations of substituted 3-[(3-or 4-carboxyethylpyrrol-2-yl)methylideny]indolin-2-ones as inhibitors of VEGF, FGF, and PDGF receptors tyrosine kinases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 25, p. 5120-5130. 1999.

UNANDER, D.W.; WEBSTER, G. L.; BLUMBERG, B. S. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. **J. Ethnopharmacol.**, v.45, n.1, p.1-18. 1995.

VENUKUMAR, M.R.; LATHA, M.S. Hepatoprotective effect of the methanolic extract of *Curculigo orchioides* in CCl₄ treated male rats. Pharmacognosy Research Laboratory, School of Biosciences, Mahatma Gandhi University, P.D. Hills P.O., Kottayam-686560, Kerala. **Indian Journal of Pharmacology**, 34: 269-275. 2002

VERPOORTE, R. Methods for the structure elucidation of alkaloids. **Journal of Natural Products**, v.49, p.1-25. 1986.

VERPOORTE, R.; VAN DER HEIJDEN, R.; MEMELINK, J. Engineering the plant cell factory for secondary metabolite production. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 9, p. 323-343. 2000.

VIEIRA LS. **Fitoterapia da Amazônia. Manual de plantas medicinais. A farmácia de Deus.** 2^a ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1992

VIEIRA, J.R.C.; SOUZA, I.A.; NASCIMENTO, S.C.; LEITE, S.P. *Indigofera suffruticosa*: an alternative anticancer therapy. **eCAM**, p.1-5. 2007.

VIEIRA, J.R.C. *Investigaçāo farmacognóstica e biológica de folhas de Indigofera suffruticosa Mill sobre Aedes aegypti*. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Departamento de Ciências Farmacêuticas. Recife: Universidade Federal de Pernambuco. 2011.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. Drogenanalyse. Berlin: Springer-Verlag, p.164, 1984.

WANI, M.C. et al. Plant Antitumor Agents. VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p.2325-2327. 1971.

WEIBEL, E.R.; STÄUBLI, W.; GNÄGI, H.R.; HESS, F.A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. **J Cell Biol**, v.42, p.63-91. 1969.

WOJCIECHOWSKI, M.F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M.J. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**, v.91, n.11, p.1845-1861. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO sites. Globalization, trade and health. Glossary of terms. Pharmaceutical Industry. Disponível em: www.who.int/trade/glossary/story073/en/. Acesso em: junho. 2009.

ZUCKERBERG, C. *Estrutura e histoquímica del Sarcoma 180*. Tese (Doutorado). Bueno Aires: Universidade de Bueno Aires. 1972.

ZUCKERBERG, C. Ultraestrutura of Sarcoma 180. Cancer Research, Philadelphia, v. 33, p. 2278-2282. 1973.