

JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

***Indigofera suffruticosa* Mill: UM MEIO
TERAPÊUTICO ALTERNATIVO ANTI-CÂNCER**

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



**UFPE
RECIFE, PE - BRASIL**

2007

JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

***Indigofera suffruticosa* Mill: UM MEIO
TERAPÊUTICO ALTERNATIVO ANTI-CÂNCER**

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Patologia do Centro de ciências da
Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Patologia - Área de
concentração – Patologia Geral.**

ORIENTADORA: Prof^a. Dra. Sônia Pereira Leite

RECIFE, PE - BRASIL

2007

Vieira, Jeymesson Raphael Cardoso.

Indigofera suffruticosa Mill: Um meio
Terapêutico Alternativo Anti-Câncer/ Jeymesson
Raphael Cardoso Vieira- Recife, 2007.

Orientadora: Sônia Pereira Leite.

Dissertação (Mestrado) – UFPE/CCS.

1. *Indigofera suffruticosa* 2. Extrato aquoso
3. Atividade citotóxica 4. Atividade Antitumoral.

UFPE/BC



Universidade Federal de Pernambuco
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE MESTRADO EM PATOLOGIA

AUTOR: JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA GERAL

**NOME DA TESE: "ATIVIDADE ANTITUMORAL DE FOLHAS DE INDIGOFERA
SUFFRUTICOSA".**

ORIENTADORA: Professora Sonia Pereira Leite

TESE DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA

DATA: 13 de fevereiro de 2007

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Adriana Maria da Silva Teles

Adriana Maria da Silva Teles

Profa. Liriane Baratella Evêncio

Liriane Baratella Evêncio

Profa. Ivone Antonia de Souza

Ivone Antonia de Souza

***Indigofera suffruticosa* Mill:**
UM MEIO TERAPÊUTICO ALTERNATIVO ANTI-CÂNCER

Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

BANCA EXAMINADORA:

Ivone Antônia de Souza

Prof^ª. Adjunta do Departamento de Antibióticos/CCB/UFPE

Liriane Baratella Evêncio

Prof^ª. Adjunta do Departamento de Histologia e Embriologia/CCB/UFPE

Adriana Maria Telles da Silva

Prof^ª. Adjunta do Departamento de Patologia/CCS/UFPE

Noemia Pereira da Silva Santos

Prof^ª. Adjunta do Núcleo de Ciências Biológicas/ Centro Acadêmico de Vitória (CAV)

Nicodemos Teles de Pontes Filho

Prof. Adjunto do Departamento de Patologia/CCS/UFPE

*Se podes ser melhor do que és é
evidente que ainda não és tão bom
como deves*

*A Deus, que me **gera**, **une** e **cativa**.*

*Aos meus pais, que me **geram** a cada dia.*

*Aos meus familiares, que me **unem** num só sangue.*

*Aos meus amigos, que me **cativam**.*

Santo Agostinho

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	III
ABSTRACT	IV
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
3. REVISÃO DA LITERATURA	05
3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill	05
3.2. FITOQUÍMICA	09
3.3. ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS HEp-2	12
3.4. ATIVIDADE ANTITUMORAL EM SARCOMA 180	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. MATERIAL VEGETAL	17
4.2. DROGAS, SOLVENTES E REAGENTES	18
4.3. EQUIPAMENTOS	18
4.4. OUTROS	19
4.5. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	20
4.6. ENSAIO FITOQUÍMICO	20
4.6.1. Screening Fitoquímico	20
4.7. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	21
4.8. CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i>	22
4.9. ATIVIDADE ANTITUMORAL	23
4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
5. RESULTADOS	26
5.1. SCREENING FITOQUÍMICO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>I. suffruticosa</i> OBTIDOS POR INFUSÃO	26

5.2. ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE <i>I. suffruticosa</i> EM CÉLULAS HEP-2	30
5.3. ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS AQUOSOS DE <i>I. suffruticosa</i> SOB SARCOMA 180 EM CAMUNDONGOS	31
5.3.1. Avaliação das reações comportamentais e do parâmetro corporal de Camundongos albinos suíços	31
5.3.2. Avaliação dos parâmetros tumorais de Camundongos albinos suíços	32
6. DISCUSSÃO	35
7. CONCLUSÕES	40
8. REFERÊNCIAS	41

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Ser Supremo que me ensina a amar e perdoar.

Quero aqui, em poucas palavras, agradecer àqueles que contribuíram para minha formação pessoal e profissional. Estes irão estar sempre presentes em meus pensamentos, em minha vida e em minhas orações.

Aos meus pais, que me ensinam a viver e a enfrentar todas as dificuldades que a vida me oferece, com amor, paciência e sabedoria.

Aos meus avós Iraçy e Odilon pelo amor doado ao longo de toda minha existência.

A minha família, sempre presente, me incentivando e participando de todos os momentos de minha vida.

As minhas maiores colaboradoras: minhas tias Jaçyra, Ednalda, Nira, minhas primas Karla e Kerly e a minha madrinha Irlene Galvão.

A professora Dra. Sônia Pereira Leite por acreditar e confiar em mim ao longo de todos esses anos, me orientando e corrigindo com a autoridade de uma mãe.

À professora Dra. Hélia Carnizarro por depositar em mim confiança e me ensinar a ser grande o bastante para ser visível aos olhos de Deus e da humanidade.

À professora Dra. Paloma Lys pela confiança e demonstração de afeto que sempre me motivaram.

Às professoras Dra. Ivone Souza e Silene Nascimento do Departamento de Antibióticos da UFPE pelo suporte, carinho e dedicação oferecidos durante todo este trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Cultura de Células: André Aires, André Ricardo e Emanuela Paz pela amizade, companheirismo e auxílio para realização deste trabalho.

À Silvana Paz e Sidcley do laboratório de patologia da UFPE pelo apoio técnico e profissionalismo ao repassar seus ensinamentos com paciência e dedicação.

Ao Departamento de Histologia e Embriologia, onde esta realidade pôde ser desenvolvida e finalizada.

Indigofera suffruticosa Mill: um meio terapêutico alternativo anti-câncer**RESUMO**

Indigofera suffruticosa Mill (Fabaceae) ocorre em abundância no nordeste brasileiro e tem intenso uso popular no tratamento de infecções, inflamações e outros processos. Para explorar o potencial desta planta e dar uma base científica a sua utilização, este trabalho experimental foi desenvolvido investigando-se a presença de compostos químicos majoritários em extratos de folhas de *I. suffruticosa* obtidos por infusão e os efeitos citotóxico e antitumoral dos extratos de folhas de *I. suffruticosa* obtidos por infusão e maceração. O material utilizado foi obtido a partir de um screening fitoquímico de folhas onde foram evidenciados protocolos extrativos de identificação de moléculas majoritárias presentes nas folhas. As moléculas majoritárias identificadas foram: alcalóides, polifenóis, terpenóides, açúcares e índigo. O extrato aquoso não exibiu citotoxicidade contra células HEp-2 (Human Larynx Epidermoid Carcinoma Cells) pelo método MTT. A atividade antitumoral dos extratos aquosos por infusão (64,53%) e maceração (62,62%) frente ao Sarcoma 180 em camundongos na dose de 50 mg/kg i.p., baseada na baixa ordem de toxicidade, foi comparada com o grupo controle que mostrou desenvolvimento tumoral de 100%. Os referidos extratos produziram reações comportamentais nos sistemas nervosos central e periférico sem apresentar alteração de massa muscular. Considerando a baixa ordem de toxicidade e a alta efetividade na inibição do crescimento de tumor sólido, o extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* pode ser usado como agente terapêutico alternativo anti-câncer.

Palavras-Chave: *Indigofera suffruticosa*, extrato aquoso, ensaio fitoquímico, atividade citotóxica, atividade antitumoral.

Indigofera suffruticosa* Mill: um meio terapêutico alternativo anti-câncer*ABSTRACT**

Indigofera suffruticosa Mill (Fabaceae) occurs in the Northeast countryside and has intensive popular use in the treatment of infectious, inflammatory and other processes. To explore the potential of this plant and show a scientific basis to its utilization, this experimental work was developed investigating the presence of majority molecules in aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* obtained by infusion and the cytotoxic and antitumoral effects of the extracts of *I. suffruticosa* leaves obtained by infusion and maceration. The material was obtained by a phytochemical screening of leaves where extractive protocols of identification of majority molecules present in the species. The majority identified molecules were: alkaloids, polyphenols, terpenes, sugars, and indigo. The aqueous extracts did not exhibit cytotoxicity against HEP-2 (Human Larynx Epidermoid Carcinoma Cells) cell lines by MTT method. The antitumor activity of aqueous extracts by infusion (64.53%) and maceration (62.62%) against Sarcoma 180 in mice at a dose of 50 mg/kg (i.p.), based on low order of toxicity was comparable to the control group, which showed a tumoral development of 100%. The extracts showed reaction effects in central and peripheral nervous systems and no alteration in muscle mass. Considering the low order of toxicity and the highly effective in inhibiting growth of solid tumor, the aqueous extracts of leaves of *I. suffruticosa* may be used as anti-cancer agent as an alternative therapeutic mean.

Key words: *Indigofera suffruticosa*, aqueous extract, phytochemical assay, citotoxic activity, antitumoral activity.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Folhas de <i>Indigofera suffruticosa</i>	8
Figura 2 - Ramo com vagens de <i>I. suffruticosa</i>	8
Figura 3 - Flores de <i>I.suffruticosa</i>	8
Figura 4 - Diagrama mostrando a transformação química do índigo a partir de material vegetal	10
Figura 5 - Estrutura química da indirubina	11
Figura 6 - Nova Cruz – PE	17
Figura 7 - Drogas injetadas i.p.	24
Figura 8 - Cromatograma de Triterpenos, esteróides, β -sitosterol, β -amilina de extratos de folhas de <i>Indigofera suffuticosa</i> (1- Extrato hexano precipitado; 2- Extrato hexano; 3- Extrato acetato de etila; 4- Extrato hexano (Padrão); P - padrão: Ácido ursólico, β -sitosterol, β -amilina).	28
Figura 9 - Cromatograma de triterpenos (1) de extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> (P-padrão: β sitosterol, β -amilina).	28
Figura 10- Cromatograma de iridóides (1) de extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> (P-padrão: Gervão).	29
Figura 11 - Cromatograma de leucocianinas (1) de extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> .	29

Figura 12 -	Cromatograma de alcalóides (1) de extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> (p-padrão: Pilocarpina).	30
Figura 13 -	Atividade do extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> obtido por infusão sob parâmetros corporais de camundongos. Os dados estão expressos como média $\pm$ EP seguido do teste t' student em 20 camundongos, $P < 0,005$. O grupo de infusão está comparado com o grupo controle em solução salina.	32
Figura 14 -	Aspecto geral dos tumores (Sarcoma 180) após sete dias de tratamento com extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> por infusão.	33
Figura 15 -	Aspecto geral dos tumores (Sarcoma 180) após sete dias de tratamento com extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> por maceração.	33
Figura 16 -	Efeito dos extratos aquosos de folhas de <i>I. suffruticosa</i> por infusão e maceração sob Sarcoma 180 em camundongos. Os dados estão expressos como mediana dos resultados em 30 camundongos (min-max), $*P < 0.001$. Os grupos de infusão e maceração estão comparados com o grupo controle em solução salina.	34

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Metabólitos, sistema de eluição e reveladores utilizados para o <i>Screening</i> Fitoquímico dos extratos de <i>I. suffruticosa</i> .	21
Tabela 2 - <i>Screening</i> fitoquímico de extratos de folhas de <i>I. suffruticosa</i> por infusão.	27
Tabela 3 - Atividade dos extratos aquosos de folhas de <i>I. suffruticosa</i> obtido por infusão e maceração sob células HEP-2.	30
Tabela 4 - Reações comportamentais referentes à dose testada do extrato aquoso de <i>I. suffruticosa</i> obtido por infusão e maceração durante avaliação da atividade antitumoral.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

FDA - The Food and Drug Administration

NAPRALERT - Natural Products Alert

CPA - ciclofosfamida

HEp-2 -Human Larynx Epidermoid Carcinoma Cells

DMEM - Dulbeccos' Modified Eagle Medium

i.p. - intraperitoneal

DMSO - dimetilsulfóxido

UV – ultravioleta

NEU - 2-aminoetilbutirato

MTT - [3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difenil tetrazólio]

ml - mililitro

mg - miligrama

mm - milímetro

PBS - tampão salina-fosfato

p/v – peso/volume

µl - microlitro

h - hora

nm - nanômetro

Kg - kilograma

µL - microlitro

DL₅₀ – dose letal a 50% do total de indivíduos tratados

µg - micrograma

1. INTRODUÇÃO

A quimioterapia percorre estreito caminho entre a eficácia e a toxicidade. De fato, os protocolos quimioterápicos estão muito frequentemente 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 (HAVSTEEN, 1983; CALIXTO et al., 1990; CECHINEL FILHO, 1998). Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de no futuro serem utilizadas como agentes medicinais.

O diterpeno anticancerígeno taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico, constitui-se uma grande esperança para pessoas portadoras de câncer nos ovários e pulmões (KINGSTON, 1991; HORWITZ, 1994). 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 1991 o taxol foi considerado pelo National Cancer Institute a mais importante droga contra o câncer dos últimos 15 anos e em 1992 a The Food and Drug Administration (FDA) aprovou o taxol contra o câncer de ovário recorrente. Hoje a droga é usada para vários cânceres, incluindo mama, pulmão e Sarcoma de

Karposi (AGUS et al., 1999). Entretanto, estudos visando a cura de outros tipos de câncer e de outras enfermidades com deficiente profilaxia têm avançado significativamente tanto em termos de produtos sintéticos como naturais.

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 et al., 1981; UNANDER et al., 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.

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 ao desenvolvimento dos fitoterápicos e outros medicamentos industrializados. Com o objetivo, de também possibilitar uma melhor compreensão do tema 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 da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco vêm desenvolvendo experiências com plantas medicinais da flora nordestina.

Essas plantas são estudadas quanto a seus constituintes e propriedades biológicas nestes Laboratórios. A interação desses dois setores de estudo tem detectado plantas com potentes efeitos biológicos como também os possíveis constituintes presentes em seus extratos os quais são atribuídos efeitos farmacológicos. Desse modo abrem-se perspectivas para a elaboração de pesquisas mais acuradas de plantas de expressivo potencial terapêutico. Como exemplo, podemos citar trabalhos acima referidos, com base no uso popular da *I. suffruticosa*.

A *I. suffruticosa* Mill 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. No Brasil, é encontrada praticamente em todo país, é uma forrageira anual ou perene adaptada à região do Sertão Pernambucano. O uso na medicina popular é indicado para dores articulares e nevralgias, distúrbios circulatórios, afecção das vias respiratórias, inflamação aguda da pele e hemorragias nasais. A infusão das folhas e raízes é considerada antiespasmódicas, diuréticas, estomáquicas, febrífugas, purgativas e sedativas. Emprega-se, com bons resultados esta mesma infusão contra epilepsia e icterícia. As folhas machucadas são utilizadas topicamente contra sarna, e as raízes e sementes secas e reduzidas a pó, para afugentar insetos (PIO CORREIA, 1926; BRAGA, 1976; MATOS, 1999). Estudos farmacológicos mostraram que a planta apresenta ação toxicológica e toxicogénica (RIBEIRO et al., 1991). Pesquisa recente tem realizado trabalho para explorar o potencial desta planta e dar uma base científica a sua utilização (LEITE et al., 2003, 2004, 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 verificar as atividades antitumoral e citotóxica de extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*.

2. OBJETIVOS

Geral

Realizar um estudo fitoquímico nas folhas da espécie *I. suffruticosa* Mill (Fabaceae) ocorrente no Estado de Pernambuco através de cromatografia em camada delgada.

Contribuir para o aprofundamento dos conhecimentos relativos às propriedades Biológicas *in vivo* e *in vitro* do gênero *Indigofera* e dar subsídios às potencialidades da planta como agentes medicamentosos e ou tóxicos.

Específicos

Investigar a presença de compostos químicos majoritários em extratos de folhas de *I. suffruticosa*

Avaliar a atividade citotóxica do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* pelo método MTT.

Avaliar a atividade antitumoral de extratos aquoso de folhas de *I. suffruticosa* em camundongos albinos suíços.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A *I. suffruticosa* Mill

A Família Fabaceae é constituída por cerca de 12.000 espécies inseridas em 482 gêneros, amplamente distribuídos na natureza. No Brasil, estão presentes 88 gêneros nativos ou subespontâneos e 19 cultivados. No sensu de Cronquist (1981), pertence a subclasse Rosidae que é formada por planta considerada sob ponto de vista evolutivo como intermediário entre Magnoliidae primitivas e Asteridae avançadas. Em 1989, Dahlgren relacionou o padrão metabólico filogeneticamente nas diversas subclasses em angiospermas. A partir desses estudos, esse pesquisador expandiu a classificação sistemática de Cronquist/Takhtajan, sistema estes que distribuíam as famílias dicotiledônicas em seis ordens, para 25 superordens em Magnoliopsida (DAHLGREN, 1995).

Dentre os numerosos gêneros da família Fabaceae, encontra-se aquele denominado *Indigofera*. A origem da palavra *Indigofera* provém da palavra alemã - índigo que significa produção de pigmento azul (índigo blue) que pode ser extraído de *I. tinctorias* e de outras cinco espécies. O gênero *Indigofera* apresenta-se como um arbusto herbáceo, vegetando espontaneamente em quase toda parte e, em especial nas imediações de cidades e vilas. Possui abundante ramagem verde – esbranquiçada, revestida de pêlos e folhas elípticas compridas e em forma de palmas. Suas flores, róseas e miúdas, desabrocham em pequenos cachos, os frutos, em forma de vagens arredondadas e recurvas, contêm sementes parecida com feijão (Figuras 2 e 3).

Possui raiz principal sobre suas ramificações. *Indigofera* é um gênero amplamente distribuído com espécies ocorrentes na Ásia, México, Europa e América (BARROSO, 1984).

O uso mais conhecido e antigo do gênero *Indigofera* é a produção do pigmento azul. No século XVI, o pigmento atingiu preço equivalente a 220 dólares/kg e era mais importante para os europeus do que o cravo da Índia. Com a colonização, as Américas passaram a ser grandes fornecedores do pigmento. A indústria usou o índigo até o início do nosso século quando a produção sintética de anilina substituiu o pigmento natural. Ainda hoje, as comunidades do interior do Brasil fabricam e usam o pigmento para colorir roupas de lã e algodão. A tecnologia de produção consiste em fermentar as folhas para liberar o pigmento, produzindo um macerado esverdeado que é coado e alcalinizado com soda ou cinza, obtendo-se assim o pigmento azul (ALLEN et al., 1981; RODRÍGUES-KÁBANA et al., 1988).

O principal uso atual da *Indigofera* sp. é adubação verde e cobertura de solo. Diversas espécies são usadas como forrageiras anuais ou perenes, porém algumas espécies como a *I. spicata* apresenta toxicidade (AYLWARD et al., 1987). Espécies arbóreas são usadas em países da Ásia, no sombreamento de culturas como chá, café e cacau. No Brasil, a espécie mais comum é a *I. hirsuta*, de crescimento espontâneo em todo sudeste. A espécie vegetal *I. hirsuta* é usada como adubo verde e forragem e tem sido recomendada como potencialmente controladora de nematóides. Como forragem é bem aceita pelos animais após a fenação (ALLEN et al., 1981; AYLWARD et al., 1987).

O uso potencial, incluindo o controle de erosão em áreas arenosas por espécies rasteiras, como *I. miniata*; revegetação por espécie arbóreas de crescimento rápido, *I. tesymanni*; muito plantada no Sri-Lanka, apresenta crescimento extremamente rápido, podendo alcançar a altura de 7 metros em um ano (ALLEN et al., 1981).

A *Indigofera suffruticosa* Mill da família Fabaceae (Figura 1, 2 e 3) é bem representada na região do Agreste Pernambucano, comum em toda região tropical e subtropical (BRAGA, 1985). Diversos usos medicinais são registrados para *I. suffruticosa* destacando-se o uso das folhas como agente antiespasmódico, sedativo, estomático, diurético e purgativo, antiepilético, anticonvulsivante e antiinflamatório e da raiz na icterícia (LEITE et al., 2003; BHASKAR et al., 1982; ROIG, 1974). Recentemente, efeitos embriotóxicos e atividade antimicrobiana têm sido relatados (LEITE et al., 2003, 2004, 2006). Esta planta também é empregada nas mordeduras de cobras e como insetífuga, sendo esta última propriedade extensiva às sementes após serem pulverizadas (ROIG, 1974; ALEJO et al., 1996). Possui propriedades medicinais nos tratamentos de febres, parasitoses, doenças de pele e problemas cardíacos (ALLEN et al., 1981).

As espécies são uma das maiores em dicotiledôneas (BARROSO, 1984). No Brasil, estão presentes 88 gêneros nativos ou subespontâneos e 19 cultivados. Segundo Braga (1976), *I. suffruticosa* Mill é um arbusto de 1-2 m de altura e com ramos pubescentes. Suas folhas são pínadas, com 7-15 folíolos oblongos ou ovais, glabros na face e no verso. As flores são miúdas, numerosas, albo-róseas ou amareladas, em racemos axilares. Possui pequena vagem com 6-10 sementes parecida com feijão.

De modo geral, caracterizam-se como ervas anuais e perenes, eretas, prostadas, difusas ou escandentes, subarbusto, arbustos eretos e árvores de pequeno, médio e grande porte, com sistema radicular bem desenvolvido e predominância da raiz principal sobre suas ramificações. São pouco exigentes e crescem em solos de baixa fertilidade, ocorrendo naturalmente em beira de estradas (BARROSO, 1984). No Brasil encontra-se registro da espécie nos Estados do Mato Grosso (FERRAZ et al., 1998), Alagoas (RIBEIRO et al., 1984), Ceará, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Pará (BARBOSA-NETO et al., 2001) e Paraíba (RIET-CORREA, 2000).



Figura 1. Folhas de *Indigofera suffruticosa*



Figura 2. Ramo com vagens de *I. suffruticosa*



Figura 3. Flores de *I. suffruticosa*

3.2. FITOQUÍMICA

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

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.

Com base nas informações sobre a composição química de *I. suffruticosa* ocorrentes na China, Deng (1981 e 1986), isolou e caracterizou os pigmentos índigo e indirorubina. O complexo índigo, um pó a base das folhas da *I. suffruticosa*, casca de *Phellodendro chinense* e bile de porco é utilizado para o tratamento da tuberculose dos nódulos de linfoma cervical. Os resultados experimentais mostraram que o complexo índigo produz um efeito leucogênico (LIU-CX et al., 1991).

O índigo é um dos pigmentos mais antigos já conhecidos. É derivado de glicosídeo incolor da forma enol do indoxil (indican) e é formado a partir da fermentação do material vegetal, bem como *Baphicacanthus cusia* Brem, *Indigofera suffruticosa*, *Polygonum tinctorium*, *Isatis indigotica*, seguido por oxidação pelo ar do indoxil (MINAMI et al., 1996, 1997) (Figura 4).

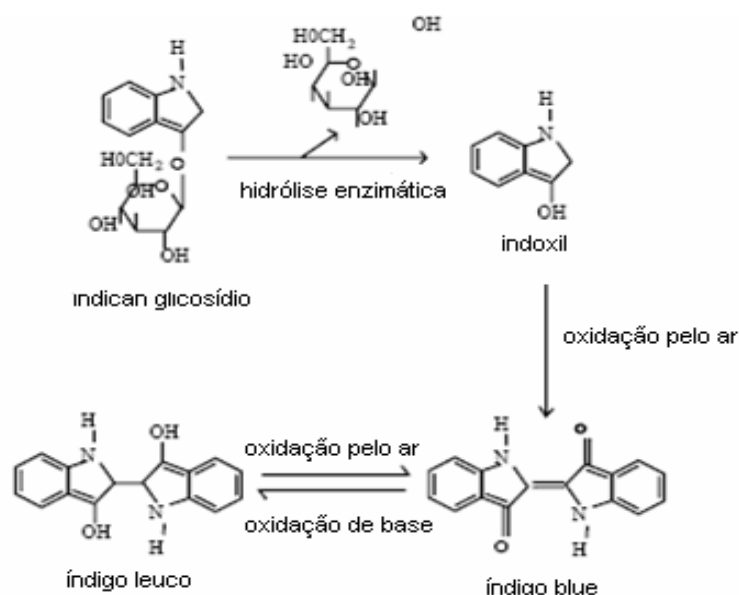


Figura 4. Diagrama mostrando a transformação química do índigo a partir de material vegetal (CHANAYATH et al., 2002).

O pigmento indirubina (Figura 5), que é avermelhado é similar ao indigo blue em sua estrutura e foi isolado de *Polygonum tinctorium* (MAIER et al., 1990; SHIN e LEE, 1993). Contudo, o pigmento indigorubina foi também isolado de extrato bruto de *Baphicacanthus cusia* Brem. (BEN, 1981; TANG, 1987). Indirubina inibiu o carcinoma pulmonar de Lewis em camundongos e o carcinosarcomama 256 de Walker em ratos (JI et al., 1981). Em um estudo clínico, o tratamento com indirubina em pacientes com leucemia mielocítica crônica nas doses diárias de 300-450 mg mostrou completa diminuição em 26% e parcial diminuição em 33,4% dos 314 casos mostrando baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais (Indirubin Cooperative Group, 1980).

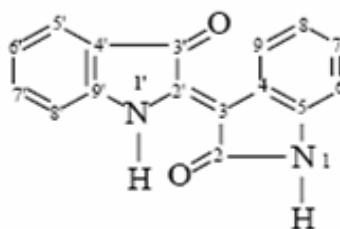


Figura 5. Estrutura química da indirubina (CHANAYATH et al., 2002).

No México, Domingues et al. (1978) realizaram pesquisas iniciais sobre a fitoquímica, referindo-se aos componentes químicos de “jiquelite” da *I. suffruticosa*.

Gustine (1979) e Williams (1991) verificaram a presença de nitro componente encontrado na espécie em estudo.

Paiva et al., (1987) estudaram a análise quantitativa de proteína e fibra bruta de *I. suffruticosa* sendo considerada um bom indicativo para forragem de ruminantes.

Kamal e Mangla (1993) investigando diferentes órgãos como raiz, caule, folhas e frutos de *I. suffruticosa* identificaram, caracterizaram e quantificaram seis retenóides verificando a bioeficácia desta planta contra larvas de *Anopheles* e *Callosobruchus chinensis* adultos.

Foi feita investigação referente à fitoquímica do gênero *Indigofera*, incluindo as espécies: *I. spicata*, *I. linnaei*. Vários autores (AYLWARD et al. 1987, MAJAK et al. 1992) isolaram o composto químico ácido 3-nitropropanóico. Entretanto, para a espécie *I. suffruticosa*, o primeiro relato do isolamento do ácido 3-nitropropanóico foi feito por Garcez et al., (1989) e Garcez et al., (2002).

3.3. ATIVIDADE CITOTÓXICA EM CÉLULAS HEP-2

Um grande avanço na cultura de tecidos ocorreu quando Carrel (1912) observou que a adição de extratos aquosos de embrião em plasma de galinha possibilitava a proliferação celular contínua. A técnica de crescimento de tecidos em plasma coagulado complementou-se com o extrato de embrião e o processo foi feito rotineiramente, no entanto um dos maiores problemas foi a contaminação bacteriana.

A partir da década de 50, o uso de cultura de tecidos foi sendo cada vez mais empregado em todos os ramos da biologia e começou a ser utilizado em células dispersas em cultura.

Dentre as diversas aplicações da cultura de células pode-se citar: o estudo do desenvolvimento das células neoplásicas; os resultados advindos da manipulação genética; produção de vacinas; fusão celular que posteriormente revolucionou a imunologia através de produção de anticorpos monoclonais; inserção de genes apropriados dentro de células humanas normais para torná-las imortais e produzir substâncias farmacologicamente ativas (NASCIMENTO, 1992).

Na pesquisa de drogas antineoplásicas utilizando células cultivadas, é muito importante a escolha da linhagem celular, para que seja obtido um resultado fidedigno. São disponíveis três categorias de linhagem celular: a linhagem primária, contínua e de vida finita. A escolha da linhagem deve ser feita de acordo com o tipo de pesquisa. A linhagem primária é útil para o isolamento primário de vírus, testes imunológicos, provas bioquímicas, estudos citogenéticos, determinação de citotoxicidade e mecanismo de ação de fármacos. A adoção de

linhagem contínua ou de vida finita deve ser baseada na resposta da linhagem ao fim destinado, duração do projeto, massa celular necessária, tipo de cultura requerida e disponibilidade de equipamento de base (O'PESSOA, 1992).

Embora os testes “in vitro” sejam bastante utilizados, há uma considerável limitação dos mesmos: compostos, os quais são ativos através da transformação de metabólitos, são efetivos só se testados “in vivo”. A ciclofosfamida (CPA), largamente utilizada na terapia do câncer, não mostra qualquer atividade citotóxica “in vitro”. O composto pode ser transformado em metabólitos ativos alquilantes por enzimas microssomais localizadas no fígado (DOLFINI et al., 1973).

As células HEp-2 (Human Larynx Epidermoid Carcinoma Cells) são derivadas de tumor primário de laringe humana, que após sofrerem várias passagens em ratos, foram transplantados em cultura de tecidos como uma linhagem de células contínuas (RODRIGUES, 2001). Em DMEM (Minimum Essencial Medium Eagle Modified Dulbecco's), crescem aderidas às superfícies formando monocamadas. Apresentam formas e tamanhos variados conforme a fase do ciclo celular, sendo fusiformes antes do período que antecede a sua divisão, quando então, aumentam de volume e tornam-se arredondadas. É possível encontrar células com um ou mais nucléolos (RODRIGUES, 2001).

3.4. ATIVIDADE ANTITUMORAL EM SARCOMA 180

As células de um organismo multicelular vivem em uma verdadeira sociedade, sempre em interdependência. Qualquer mutação que dê origem a um comportamento celular diferente do habitual irá comprometer o equilíbrio do tecido ou mesmo do organismo. Assim

sendo, qualquer célula que carregue tal alteração deve ser eliminada para evitar, por exemplo, a formação de um tumor maligno. Mutações, competição e seleção natural, operando na população de células somáticas, são estágios importantes do desenvolvimento do câncer. Uma vez estabelecido, o tumor passa a agir como um parasito, competindo com o organismo por nutrientes e debilitando-o. Além disso, substâncias com ações deletérias podem ser produzidas na interação tumor-hospedeiro, contribuindo para o quadro de caquexia visto nos pacientes portadores de neoplasias malignas.

Conceitualmente, uma neoplasia é uma massa anormal de tecido cujo crescimento ultrapassa e se mostra desordenado, quando comparado ao dos tecidos normais, e persiste da mesma maneira excessiva, mesmo após o estímulo que provocou todas as mudanças ter cessado (BUCHI, 2002).

O principal objetivo do tratamento das neoplasias é obter a completa erradicação das células tumorais. Tal resultado pode ser obtido através de procedimentos como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, isoladas ou em associação. A quimioterapia, tratamento que envolve drogas citotóxicas, tem sido considerada como uma das principais ferramentas sistêmicas contra o câncer. Pode ser aplicada em diferentes situações clínicas, como no tratamento primário de neoplasias avançadas, sendo denominada, neste caso, de quimioterapia de indução. Pode também ser utilizada como tratamento sistêmico após o controle do tumor primário por cirurgia ou radioterapia. Sempre, no entanto, deve ser considerada a eficácia da droga em relação ao tipo de tumor. Há disponível uma grande variedade de drogas citotóxicas, muitas das mais potentes atuam em fases específicas do ciclo celular e, por esta razão, apenas exercem sua atividade contra

células que se encontram em processo de divisão. Os tumores que apresentam alta taxa de crescimento, ou seja, um alto percentual de células em processo de divisão é o mais susceptível ao tratamento quimioterápico. Entre as drogas utilizadas podem ser citados os agentes alquilantes (mostarda nitrogenada, sulfonatos alquílicos, nitrosuréias e triazenos), antimetabólicos (análogos do ácido fólico, pirimidinas e purinas), alcalóides vegetais (alcalóides da *Vinca*) e antibióticos como a bleomicina e mitomicina entre outros. Os mecanismos bioquímicos de resistência à quimioterapia parecem ser os maiores obstáculos ao sucesso do tratamento. Alguns fatores têm sido associados ao desenvolvimento da quimiorresistência, como a amplificação ou superexpressão da família de transportadores de membrana, chamadas de glicoproteínas P, alteração nas proteínas celulares envolvidas na detoxificação (ex.: bleomicina hidrolase) ou ativação do quimioterápico (ex.: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato citocromo P-450 redutase), alteração nas moléculas envolvidas no reparo do DNA, em especial a DNA Topoisomerase II e a ativação de oncogenes, como bcl-2, ras ou p-53 mutante (EL-DEIRY, 1997). As limitações observadas pelo emprego das terapêuticas convencionais como a cirurgia, radio e quimioterapia, muitas vezes não permitem a total erradicação das neoplasias. Assim, alternativas têm sido propostas.

Nas últimas décadas a medicina homeopática obteve notável reconhecimento na procura de novas soluções terapêuticas para a prática médica. Com esta abertura, o conhecimento médico tem sido enriquecido com novos conceitos e critérios, permitindo o impulso dado pelas pesquisas na área biológica para encontrar caminhos que representem fontes importantes de esperança e de alívio para o ser humano. Medicamentos homeopáticos vêm sendo usados cada vez mais e em situações diversas, como por exemplo, no tratamento de estomatite após transplante de medula óssea (OBERBAUM et al., 2001).

O Sarcoma 180 (S-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). O tumor invade músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos. Apesar de seu comportamento agressivo local, esta neoplasia não produz metástases (KURASHIGE et al., 1982). 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 280 a 300 dias (ZUCKERBERG, 1973; KAWAKUBO et al., 1980). A forma sólida é pouco hemorrágica e se caracteriza pelo rápido crescimento, atingindo 18x14x10 mm por volta de sete dias após o transplante (O'PESSOA, 1992).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

O vegetal foi coletado na fase adulta, no período da floração. O material para estudo botânico foi acondicionado entre folhas de jornal, prensado e transportado até o laboratório onde foi efetuada a herborização. Aqueles destinados aos protocolos fitoquímicos foram acondicionados em saco plástico, procedendo-se seu encaminhamento ao laboratório para as operações extrativas.

A espécie *I. suffruticosa* foi coletada na cidade de Nova Cruz no Estado de Pernambuco – Brasil (Figura 6) em março 2005. As folhas foram separadas e imediatamente utilizadas na produção de extrato aquoso para avaliação das atividades citotóxica e antitumoral de folhas frescas. A amostra da planta encontra-se catalogada sob o número 43694 no Herbário da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).



Figura 6. Área de coleta da espécie *I. suffruticosa* (*)/ Nova Cruz - PE

4.2. DROGAS, SOLVENTES E REAGENTES

Hexano	PA	MERCK
--------	----	-------

Acetato de etila	PA	MERCK
------------------	----	-------

Metanol	PA	MERCK
---------	----	-------

Água destilada

Solução salina (NaCl)

MTT [3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difenil tetrazólio]

DMSO (dimetilsulfoxido)

DMEM (Dulbeccos' Modified Eagle Médium)

PBS (tampão salina-fosfato pH 7,2)

Gel de sílica 20x20cm (0,25mm de espessura)

4.3. EQUIPAMENTOS

Balança FILIZOLA mod.p/5kg

Balança eletrônica de precisão GEHAKA mod. BG 1000

Câmara ultravioleta (250-365nm) CHOMATO VUE

Corante vital Azul de Tripan (Merk) 0,4% p/v

Leitor óptico ELX 800

Microscópio invertido LEITZ

Destilador FABBE-PRIMOR mod. 105

Placa aquecedora com agitador magnético, FISATON mod. 752^A

Autoclave (IBCC) mod. HI 300N

Estufa bacteriológica (315 FANEM)

Estufa de esterilização (FANEM) mod. 311 110V

Capela de fluxo laminar (TROX FLV 503)

Freezer Cônsul 300L (CVU30C)

4.4. OUTROS

Estantes

Placas de petri e Frascos Âmbar

Pipetas graduadas 1,5 e 10mL

Pinça metálica

Ponteiras 0,1 e 1mL

Câmara fotográfica Exilim (10.1 Mega Pixels)

4.5. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados Camundongos albinos suíços machos (*Mus musculus*) (Figura 7), com idade de 50 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 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 34/05 de julho de 2005.

4.6. ENSAIO FITOQUÍMICO

4.6.1. Screening Fitoquímico

Extratos aquoso, metanólico, hexano e acetato de etila de folhas de *I. suffruticosa* por infusão foram submetidos à filtração simples em papel e posteriormente, analisados por cromatografia em camada delgada. Foram utilizadas placas de gel de sílica 20x20cm (0,25mm de espessura) com sistema de desenvolvimento e reveladores adequados empregando-se padrões cromatográficos conforme Tabela 1 (MARKHAN, 1982; HARBONE, 1982; WAGNER et al., 1984). Foi investigada a presença de: alcalóides, polifenóis (cumarinas, derivados cinâmicos, flavonóides e leucocianidinas), terpenóides (triterpenos, esteróides, iridóides e saponinas), índigo e açúcares (Tabela 1).

Tabela 1 - Metabólitos, sistema de eluição e reveladores utilizados para o Screening Fitoquímico dos extratos de *I. suffruticosa*.

METABÓLITOS	SISTEMA DE ELUIÇÃO	REVELADORES	REFERÊNCIA
Alcalóides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	Dragendoff	(WAGNER, 1984)
Triterpenos e esteróides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:0.5:0.5:0.5v/v)	Lieberman/ Burchard	(HARBONE, 1982)
Iridóides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	Vanilina sulfúrica	(WAGNER, 1984)
Saponinas	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	Vanilina sulfúrica	(WAGNER, 1984)
Açúcares	n-BuOH-Me ₂ CO-Tampão fosfato pH=5,0 (40:50:10v/v)	Trifenilietetrazólio	(METZ, 1961)
Cumarinas	Éter-tolueno-AcOH 10% (50:50:50v/v)	UV	(WAGNER, 1984)
Derivados cinâmicos	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	NEU	(MARKHAN, 1982) (NEU, 1956)
Flavonóides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	Difenilboriloxietil amina	(WAGNER, 1984) (MARKHAN, 1982)
Leucocianidinas	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	Vanilina clorídrica	(HARBONE, 1982)
Índigo	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	UV	(MARKHAN, 1982))

4.7. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Extratos foram preparados por infusão e maceração a partir de 150g de folhas frescas de *I. suffruticosa*. O material foi pesado, triturado e extraído com solventes de polaridade

crescente (hexano, acetato de etila e metanol) e água. O extrato por infusão foi preparado com 75g de folhas frescas em 2x200ml dos solventes à 40°C por 10 min e o resíduo sólido removido por filtração. Após este passo preliminar, o resíduo foi extraído em água destilada nas mesmas condições. O extrato por maceração foi obtido seguindo o mesmo processo mencionado em temperatura ambiente (28°C) “overnight”. Os solventes foram removidos em rotaevaporador. Os rendimentos da infusão e da maceração foram respectivamente: hexano (0,67% e 0,74%), acetato de etila (0,39% e 0,34%) metanol (3,9% e 1,88%) em termos de material vegetal recém coletado. Após liofilização, os extratos aquosos renderam 4,20% e 1,75% e o material seco foi estocado à -20°C (MCDLOUD, 1988; LEITE, 2003; VIEIRA, 2006). Os extratos aquosos por infusão e maceração foram usados para as atividades citotóxica e antitumoral.

4.8. CITOTOXICIDADE *in vitro*

As células HEP-2 (Human Larynx Epidermoid Carcinoma Cells) foram obtidos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco UFPE/ Brasil e mantidas de acordo com o protocolo estabelecido pelo laboratório de cultura de células do Departamento citado acima.

A avaliação da atividade citotóxica foi feita pelo método colorimétrico do brometo [3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difenil tetrazólio] (MTT) (GERAN et al., 1972; MOSMANN, 1983 modificado por ALLEY et al., 1988) que considera citotóxico extratos com concentrações maiores que 30 µg/ml. Células HEP-2 (10⁵ células/ml) foram mantidas em DMEM- Minimum Essencial Medium Eagle Modified Dulbecco's (Sigma) que foi preparado conforme instruções do fabricante, suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UL/ml + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina 200 mM.

Para determinar a viabilidade celular foi utilizado o corante vital Azul de Tripan (Merk) 0,4% p/v em PBS (tampão salina-fosfato pH 7,2), o qual penetra facilmente nas células danificadas corando-as em azul, enquanto as células íntegras permanecem incolor, permitindo assim, determinar a percentagem de células vivas e células mortas (WEISENTHAL et al., 1983).

A contagem das células foi realizada em microscópio invertido LEITZ, com a utilização de um hemocitômetro, preenchido com uma alíquota da suspensão de células homogeneizada. As células foram distribuídas em placas de cultura com 96 poços (220µL em cada poço), as quais foram incubadas por 24h a 37°C em estufa, com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂. Os extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* obtidos por infusão e maceração foram dissolvidos em DMSO (dimetilsulfoxido) em concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/ml e adicionados nos poços com as células HEp-2. Cada concentração foi testada em quadruplicata. Como controle foi utilizado o DMEM com o DMSO. Após 72 h de contato das células com o produto teste, foi adicionado 25µl de MTT e uma concentração de 5mg/ml de PBS foram adicionados aos poços e a placa foi incubada por 2 h. A densidade óptica foi mensurada a 550 nm com um leitor ELX 800 (GERAN et al., 1972, MOSMANN 1983 modificado por ALLEY et al., 1988).

4.9. ATIVIDADE ANTITUMORAL

O Sarcoma 180 foi obtido do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco UFPE/ Brasil e mantido de acordo com o protocolo estabelecido pelo laboratório de cultura de células do Departamento citado acima.

Camundongos albinos suíços machos foram pesados e divididos ao acaso em três grupos de dez animais. Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal (i.p.) (Figura 7). Em todos

os grupos foi injetado 0,3 ml de células do Sarcoma 180 i.p. (aproximadamente 3×10^6 células). 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 48 horas do implante, 0,2 ml/kg i.p. de veículo salino foi administrado no grupo controle (grupo 1). Foi preparada uma solução estoque com uma concentração de 4,19 mg/ml e com volume necessário para todo o período de tratamento. Esta solução foi acondicionada à 2°C em frasco âmbar hermeticamente fechado. A quimioterapia foi iniciada fazendo uso do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* por infusão (grupo 2) e por maceração (grupo 3) em doses diárias de 50 mg/kg i.p. por sete dias consecutivos. A dose do extrato foi baseada na baixa ordem de toxicidade (não foi possível a determinação da DL_{50} para extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*) (LEITE, 2003). No oitavo dia do experimento, os camundongos foram sacrificados para avaliação da atividade antitumoral (STOCK et al., 1955).



Figura 7. Drogas injetadas i.p.

Ao término do tratamento, os animais foram pesados e sacrificados por deslocamento cervical, em seguida foi realizada uma incisão na área de localização do tumor e após a retirada, cada massa tumoral foi pesada para avaliação da inibição tumoral. O mesmo procedimento foi adotado para o grupo controle.

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).

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

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

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros corporais dos animais estão expressos em média $\pm$ EP seguido do teste “t” student, $p < 0,005$. Os parâmetros tumorais foram analisados utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) seguidos de Kruskal-Wallis onde $p < 0.001$. As atividades antitumoral foram expressas em Mediana (min-max).

5. RESULTADOS

5.1. SCREENING FITOQUÍMICO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *I. suffruticosa* OBTIDOS POR INFUSÃO

Os resultados dos ensaios fitoquímicos obtidos a partir de extratos aquoso, metanólico, hexano e acetato de etila de folhas de *I. suffruticosa* encontram-se expressos na Tabela 2. Esses extratos foram investigados com base em técnicas de cromatografia de camada delgada e caracterização que permitem detectar ausência e presença das classes de compostos químicos. Os extratos hexano e acetato de etila (Figura 8) apresentaram rendimento de 0,67% e 0,39% respectivamente e mostraram a presença de: terpenóides (derivados azulênicos, β -sitosterol, β -amilina, triterpenos e esteróides polares) e ausência de alcalóides, flavonóides polares, derivados cinâmicos, cumarina, e fenilpropano glicosídeo. No metanólico (3,9%) foi detectada a presença de: alcalóides, terpenóides (esteróides, triterpenos), índigo, polifenóis (flavonóides, cumarinas) e carboidratos e ausência de iridóides e saponinas. O extrato aquoso (4,2%) apresentou derivados cinâmicos, triterpenos (Figura 9), iridóides (Figura 10), leucocianidina (Figura 11) carboidratos e índigo, não sendo detectada a presença de flavonóides, alcalóides (Figura 12) e cumarina.

Tabela 2. Screening fitoquímico de extratos de folhas de *I. suffruticosa* por infusão.

Extrato	Rendimento (%)	Positivo	Negativo
Aquoso	4,20	Carboidratos, glicoproteínas, derivados cinâmicos, iridóides, triterpenos e leococianidinas	Alcalóides, flavanóides e cumarinas
Metanólico	3,90	Alcalóides, esteróides, triterpenos, índigo, flavonóides, carboidratos e cumarinas	Iridóides e saponinas
Hexano	0,67	β sitosterol, β amilina, triterpenos, esteróis e derivados azulênicos	Alcalóides, flavonóides polares, derivados cinâmicos, cumarina e fenilpropano glicosídeo
Acetato de etila	0,39	β sitosterol, β amilina, triterpenos, esteróis e derivados azulênicos	Alcalóides, flavonóides polares, derivados cinâmicos, cumarina e fenilpropano glicosídeo

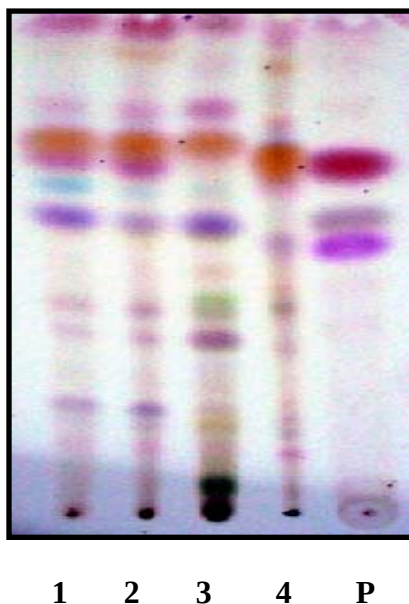


Figura 8 - Cromatograma de Terpenóides (triterpenos, esteróides, β -sitosterol, β -amilina) de extratos de folhas de *Indigofera suffruticosa* (1-Extrato hexano precipitado; 2- Extrato hexano; 3- Extrato acetato de etila; 4-Extrato hexano (Padrão); P - padrão: Ácido ursólico, β -sitosterol, β -amilina).



Figura 9. Cromatograma de triterpenos (1) de extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* (P-padrão: β sitosterol, β -amilina).

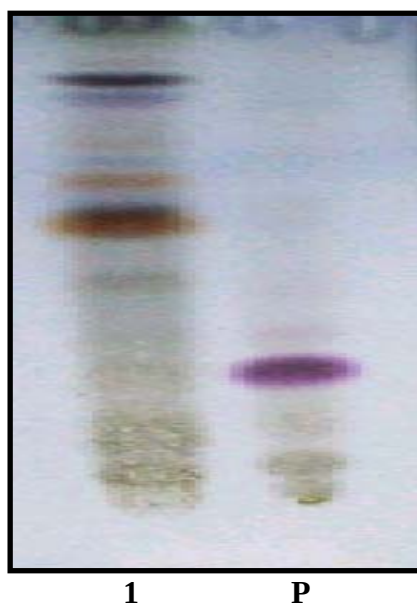


Figura 10. Cromatograma de iridóides (1) de extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* (P-padrão: Gervão).



Figura 11. Cromatograma de leucocianinas (1) de extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*.

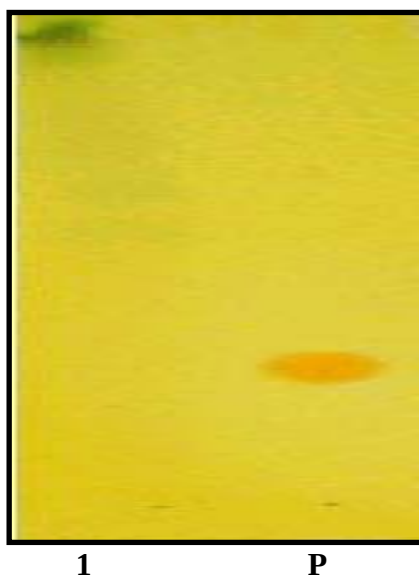


Figura 12. Cromatograma de alcalóides (1) de extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* (p-padrão: Pilocarpina).

5.2. ATIVIDADE CITOTÓXICA DE EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE *I. suffruticosa* EM CÉLULAS HEP-2

Extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* por infusão e maceração nas concentrações de 6,25 a 50µg/ml foram testados em células HEP-2 pelo método MTT. Os extratos não produziram nenhum efeito citotóxico em células da linhagem HEP-2 (<30 µg/ml) quando comparados com o controle DMEM e DMSO (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade dos extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* obtido por infusão e maceração sob células HEP-2.

Extrato	Infusão				Maceração			
Concentração (µg/ml)	6,25	12,5	25	50	6,25	12,5	25	50
Percentual de inibição (%)	15,87	12,92	17,35	19,93	15,87	19,56	22,15	17,35

5.3. ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS AQUOSOS DE FOLHAS DE *I. suffruticosa* SOB SARCOMA 180 EM CAMUNDONGOS

5.3.1. Avaliação das reações comportamentais e do parâmetro corporal de Camundongos albinos suíços.

Durante a realização do ensaio antitumoral, verificou-se que os extratos aquosos de *I. suffruticosa* obtidos por infusão e maceração produziram efeitos comportamentais nos camundongos. Esses efeitos foram observados no período de 15 minutos a quatro horas da administração do produto, sendo de forma reversível. Os animais apresentaram reações de fuga, excitação, piloereção, aumento da frequência respiratória, espasmos musculares, deambulação diminuída e contorções abdominais (Tabela 4).

Tabela 4. Reações comportamentais referentes à dose testada do extrato aquoso de *I. suffruticosa* obtido por infusão e maceração durante avaliação da atividade antitumoral.

Dose	Reações Comportamentais
50 mg/Kg	Reação de fuga, excitação, piloereção, aumento da frequência respiratória, espasmos musculares, deambulação diminuída, contorções abdominais.

O peso corporal dos animais tratados com extrato aquoso de *I. suffruticosa* obtido por infusão está expresso na Figura 13. Os animais do grupo controle e tratado apresentaram alteração de massa muscular não significativa, $p < 0,005$.

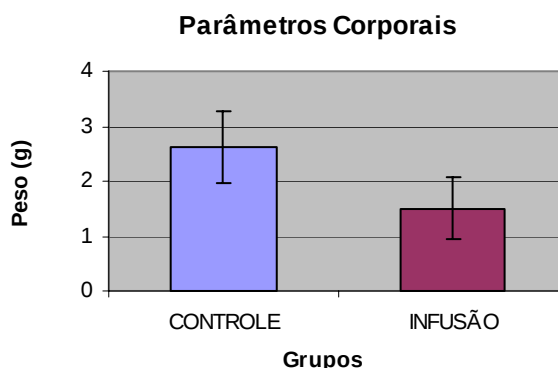


Figura 13. Atividade do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* obtido por infusão sob parâmetros corporais de camundongos. Os dados estão expressos como média $\pm$ EP seguido do teste t' student em 20 camundongos, $p < 0,005$. O grupo de infusão está comparado com o grupo controle em solução salina.

5.3.2. Avaliação dos parâmetros tumorais de Camundongos albinos suíços

Os aspectos gerais dos parâmetros tumorais (Sarcoma 180) de Camundongos após sete dias de tratamento com extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* por infusão e maceração encontram-se registrados nas Figuras 14 e 15. Contudo, a atividade do extrato aquoso por infusão e maceração está expressa na Figura 16. O extrato aquoso por infusão reduziu significativamente o peso médio do Sarcoma 180 por via i.p. na dose de 50mg/Kg (0,64 (0,01-22,10)) e o extrato aquoso por maceração reduziu (0,64(0,01-2,10)) na mesma dose quando comparado ao peso médio do tumor do grupo controle tratado com solução salina que mostrou um desenvolvimento tumoral de 100% (1,97 (1,27-2,87)). A percentagem de inibição foi 64,53% e 62,62% respectivamente com um nível de significância de $p < 0.001$. Como visto, a inibição da infusão foi dose dependente e semelhante àquela promovida por maceração na mesma dose.

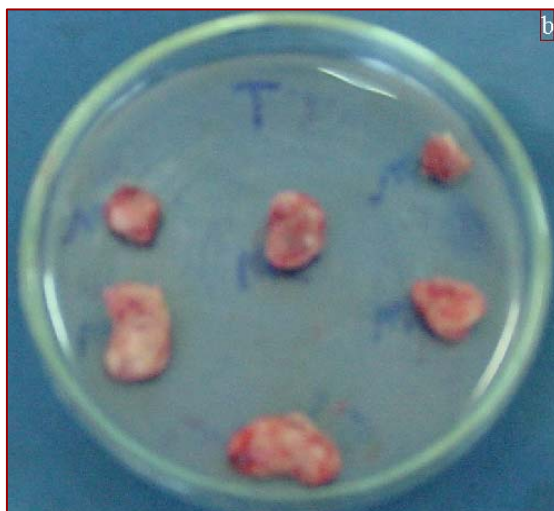


Figura 14. Aspecto geral dos tumores (Sarcoma 180) após sete dias de tratamento com extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* por infusão.



Figura 15. Aspecto geral dos tumores (Sarcoma 180) após sete dias de tratamento com extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* por maceração.

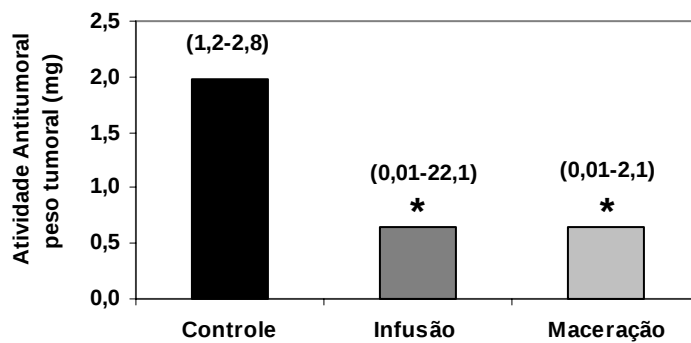


Figura 16. Efeito dos extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* por infusão e maceração sob Sarcoma 180 em camundongos. Os dados estão expressos como mediana dos resultados em 30 camundongos (min-max), * $p < 0.001$. Os grupos de infusão e maceração estão comparados com o grupo controle em solução salina.

5. DISCUSSÃO

Tratando-se do gênero *Indigofera*, nossos resultados estão compatíveis com alguns dados já registrados na literatura (NAPRALERT, 2003, LEITE, 2003). Os resultados obtidos neste trabalho mostram a presença predominante de β sitosterol, β amilina, triterpenos, esteróis e derivados azulênicos nos extratos hexano e cetato de etila de folhas de *I. suffruticosa*. Carboidratos, glicoproteínas, derivados cinâmicos, iridóides, triterpenos e leococianidinas mostraram-se presentes no extrato aquoso e alcalóides, esteróides, triterpenos, índigo, flavonóides, carboidratos e cumarinas no extrato metanólico. Estes dados foram confirmados por metodologia de precipitação em vidro de relógio empregando-se reagentes específicos de caracterização dessas moléculas (COSTA, 2000; MARKHAN, 1982; HARBONE, 1982; WAGNER et al., 1984).

Entretanto a presença do índigo no extrato metanólico das folhas de *I. suffruticosa* apresentou-se como uma molécula com forte fluorescência, sugerindo algo bastante singular e de certa forma a presença dessa molécula confirma esse táxon. Resultados similares com o índigo foram investigados por cromatografia em camada delgada e constatou-se sua presença principalmente nos frutos, e em menor teor nas folhas e caule (LEITE, 2003).

Folhas de *I. suffruticosa* são usadas popularmente como agente antiespasmódico, sedativo, estomático, diurético, purgativo, antiepilético, anticonvulsivante e antiinflamatório (LEITE et al., 2003; BHASKAR et al., 1982; ROIG, 1974). Recentemente, estudos dos efeitos embriotóxicos e atividade antimicrobiana com extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* têm sido relatados (LEITE et al., 2003; 2004; 2006).

A partir destes dados, acredita-se que é justificado o estudo do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* nas atividades citotóxica e antitumoral, visto que são abundantes as atividades biológicas relacionadas com as folhas dessa espécie.

O uso de drogas quimioterápicas do câncer envolve o risco de toxicidade nos pacientes. Pesquisas, contudo, são realizadas a fim de desenvolver drogas que atuam seletivamente no tumor. Este estudo revelou a ausência de atividade citotóxica de extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* obtidos por infusão e maceração sob células HEp-2. Trabalhos com citotoxicidade com extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* não foram encontrados na literatura o que dificulta a comparação destes resultados com outros utilizando as mesmas condições.

Extratos de plantas Umbelliferous retardaram o desenvolvimento de tumores sólidos e ascíticos e aumentaram a sobrevivência dos camundongos portadores destes tumores. Ensaio realizado com timidina e uridina tritiados sugeriram que a fração atua diretamente na síntese de DNA (BABU et al., 1995).

Extratos de *Emilia sonchifolia* foi citotóxica em células tumorais com redução de timidina tritiada, mas não em linfócitos humanos normais (SHYLESH et al., 2000).

Muitos efeitos farmacológicos observados em animais podem estender os resultados em alto valor de aplicação para a espécie humana. Baseados em bioensaios citotóxicos, mais de 400 compostos têm sido isolados de plantas, organismos marinhos e microorganismos entre 1996 e 2000 (COOPER et al., 2004). Como resultado, esta é a principal razão para o largo uso de testes toxicológicos para determinação da toxicidade e segurança quando uma droga é utilizada. (HAYES, 1989).

Leite (2003), estudando o extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*, constatou que o extrato pode ser considerado praticamente atóxico visto que a DL_{50} não pôde ser determinada, pois o extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* nas diferentes doses de 50 a 2.000mg /kg i.p. não provocou índice de mortalidade em camundongos albinos suíços durante 72hs de observação.

José Neto et al. (2001) estudando os efeitos em bovinos com doses diárias repetidas de 10 a 40 g/kg, observou apatia, piloereção, anorexia, diminuição da frequência e intensidade dos movimentos ruminais, taquicardia e dispnéia. Nesse estudo foram observados efeitos que envolvem o SNC e alterações periféricas similares aos relatados por José Neto et al. (2001).

Após a realização do ensaio toxicológico verificou-se que o extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* produziu efeitos que envolvem o Sistema Nervoso Central (SNC) e alterações periféricas. Foram observadas ações estimulantes como reação de fuga, excitação, piloereção, aumento da frequência respiratória, espasmos musculares, ação depressiva como deambulação diminuída e efeitos no trato gastrointestinal como contorções abdominais.

Numerosas espécies de *Indigofera* contêm um amino ácido indospicina, e nitropopanoil ésteres de glicose (MAJAK et al., 1992; GARCEZ et al., 2002) como produtos tóxicos naturais. Análise fitoquímica sugere que compostos com atividade biológica (alcalóides, esteróides, flavonóides, proteínas – lectina, carboidratos, índigo, etc.) nos extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* poderiam estar relacionados às atividades antiinflamatória e antimicrobiana. (JOSE et al., 2001; LEITE et al., 2003). Atividades biológicas de compostos detectados nos extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* por infusão e maceração poderiam estar ligadas à atividade antitumoral.

Extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* por infusão e maceração foram usados sob Sarcoma 180 em camundongos nas concentrações de 50mg/Kg ip. Os extratos aquosos mostraram uma atividade na redução do tumor. Estes resultados concernentes aos extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* corroboram os resultados encontrados no extrato aquoso de *Emblica officinalis* (Eupherbiacace) que demonstrou uma redução no tumor sólido em camundongos e o extrato inibiu enzimas reguladoras do ciclo celular cdc 25 fosfatase (JOSE et al., 2001).

O mecanismo pelo qual os extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* por infusão e maceração reduziram o crescimento tumoral ainda não é conhecido. Os resultados deste estudo indicam que a atividade antitumoral de extratos aquosos de folhas de *I. suffruticosa* pode estar relacionada com sua interferência no desenvolvimento celular, que será o objetivo de futuras pesquisas como na modulação da peroxidação lipídica e no sistema antioxidante de defesa (superóxido desmutase e catalase) (GUPTA et al., 2004; RAJKAPOOR et al., 2005); síntese de DNA (BABU et al., 1995); interação com a regulação do ciclo celular (JOSE et al., 2001); e atividade não esteróide antiinflamatória (KAPADIA et al., 2000). Mais recentemente, têm sido usados biomarcadores moleculares para gerenciamento oncológico como a proibitina, mortalina e HSP 60 / HSP 10 (ROSSANT et al., 1980); ácido hialurônico (CARLSON, 1996); receptor de fator de crescimento e citoqueratinas (SAWICKI et al., 1978); pesquisa de angiogênese tumoral com antígeno CD105 (BRANTNER et al. 1994); alfa-fetoproteína (AFP) (THANGADURAI et al., 2002); cicloxigenase-2 (COX-2) (CÁCERES et al., 1990) e marcadores imunohistoquímicos, tais como CD34 e CD117 (MEYER et al., 1996). Além disso, tem sido realizado estudo de fatores clínicos (taxa de crescimento tumoral, sinais inflamatórios) para analisar parâmetros como hemoglobina e contagem de células vermelhas, e estudo histológico (estágio do tumor, necrose

tumoral, estatus dos linfonodos). Os mesmos mecanismos do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* por infusão sob Sarcoma 180 podem estar envolvidos na alteração do desenvolvimento do embrião em camundongos (LEITE et al., 2004). As primeiras clivagens na embriogênese de mamíferos são divisões mitóticas simétricas que aumentam o número de blastômeros por divisão do oócito sem mudanças no tamanho do embrião. A partir do estágio de oito células à compactação, os blastômeros de murina dos embriões são totipotentes (CZARNECKA et al., 2006; CORTE et al., 2006; NAGY et al., 2006). O ciclo celular de embriões de duas células no camundongo tem duração de 20 a 26 h com as fases G1 e S que duraram aproximadamente 1 à 2 h e 6 à 7 h respectivamente; estas fases são seguidas pela fase mais longa G2 (12 à 15 h) e a fase M (mitose) de 1 à 2 h (DALLAGO et al., 2005). Muitos extratos de plantas têm sido usados como fonte de agentes medicinais para curar infecções do trato urinário, vaginite, desordens gastro-intestinais, doenças respiratórias, afecções cutâneas, infecções helmínticas, doenças de protozoários e como agentes antitumorais e antimicrobianos (BARRETO et al., 2006; MARTIN-LORENZO et al., 2006; TARKOWSKI et al., 1967; LEITE et al., 2006). Os resultados desta investigação podem aumentar nosso entendimento no uso desta planta como um meio terapêutico anticâncer. A identificação destes princípios ativos e seus mecanismos de ação precisam ser estudados. Esta é uma planta promissora para estudos futuros no desenvolvimento de novas drogas antitumorais.

7. CONCLUSÕES

Os constituintes químicos majoritários identificados nos extratos de folhas da espécie *I. suffruticosa* obtidos por infusão foram: carboidratos, glicoproteínas, derivados cinâmicos, iridóides, triterpenos e leococianidinas no extrato aquoso; alcalóides, esteróides, triterpenos, índigo, flavonóides, carboidratos e cumarinas no extrato metanólico e β sitosterol, β amilina, triterpenos, esteróis e derivados azulênicos nos extrato de acetato de etila e hexano.

Extratos aquosos obtidos por infusão e maceração não possuem atividade citotóxica nas concentrações de 6,25 a 50 μ g/ml sob células HEP-2.

Extratos aquosos obtidos por infusão e maceração nas doses de 50mg/Kg possuem atividade antitumoral *in vivo* sob Sarcoma 180.

8. REFERÊNCIAS

1. 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.
2. ALLEN, O.N.; ALLEN, E. Leguminosae: source book of Characteristics, uses and nodulation. **Washington: The University of Wisconsin Press**, p. 813, 1981.
3. ALLEY, M.C. et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v.48, p.589-601, 1988.
4. ALEJO, J. P.; MIRANDA, R.; RODRIGUES, G. Actividad Anticonvulsivante; (Antiepileptica) del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa* (Anil Cimarrón). **Rev Cubana plant Méd**, v.1, n.2, p.7-10, 1996.
5. AYLWARD, J. H. et al. *Indigofera* species with agronomic potential in the tropics. Rat toxicity studies. **Aust. J. Agric. Res.**, v.38, n.1, p.177-88, 1987.
6. BABU, T.D.; KUTTAN, G.; PADIKKALA, J. Cytotoxic and anti-tumour properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to *Centella asiatica* (L.) Urban. **J Ethnopharmacol**, v.48, p.53-7, 1995.
7. BARBOSA NETO, J.D. et al. Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.21, n.1, 2001.
8. BARROSO, G.M. Sistemática da Angiosperma do Brasil. **São Paulo: EDUSP**, v.2, 1984.
9. BEN, B.L. Column Chromatography- spectrophotometric determination of indigo and indirubin in Qingdai, a traditional Chinese medicine. **Chin. Trad. Herb. Drugs**, v.12, p.11-15, 1981.

10. BHASKAR, A.E. et al. Anti-inflammatory, analgesic activities of *Indigofera aspalathoides*. **Indian J Méd**, v.76, p.115–6, 1982.
11. BRAGA, R. Plantas do Nordeste Especialidade do Ceará. 4ª edição. **Natal: Editora Universitária da UFRN**, 1985.
12. BRAGA, R. Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará. 3ª edição. **Mossoró: Escola Superior de Agricultura**, p.452, 1976.
13. BRANTNER, A., GREIN, E. Antibacterial activity of plant extract used externally in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.44, n.1, p.35-40, 1994.
14. 41. BUCHI, D.F. Efeitos do medicamento homeopático método canova em camundongos normais e portadores de tumor sarcoma 180. **Informações científicas da jornada médica realizada em Curitiba**. 2002. SATO, D. Efeito do Método Canova sobre os parâmetros leucocitários em camundongos normais e portadores de sarcoma 180. (abril de 2002). WAL, R. Estudo histopatológico do Sarcoma 180 de camundongos tratados com medicamento homeopático Método Canova (abril de 2002). Teses de mestrado.
15. CÁCERES, A. et al. Plants used in Guatemala for treatment of gastrointestinal disorders I. Screening of 84 plants against Enterobacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.30, n.1, p.55-40, 1990.
16. CALIXTO, J. B. et al. Design of Potent Non-Peptide Competitive Antagonists of the Human Bradykinin 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.
17. CARREL, A. The preservation of tissues and its applications in surgery. **Clin Orthop Relat Res.**, v.278, p.2-8, 1912.
18. CARLSON, M.B. Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento. **Editora Guanabara Koogan S.A.**, Rio de Janeiro, 1996.

19. 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.
20. CHANAYATH, N.; LHIEOCHAIPHANT, S.; PHUTRAKUL, S. Pigment Extraction Techniques from the Leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. and *Baphicacanthus cusia* Brem. and Chemical Structure Analysis of Their Major Components. **CMU Journal**, v.1, n.2, p.149, 2002.
21. COOPER, E.L. Commentary on Traditional and Modern Biomedical Prospecting: Part II—The Benefits by Werner E.G. Müller, Heinz C. Schröder, Matthias Wiens, Sanja Perovic´-Ottstadt, Renato Batel and Isabel M. Müller: Anti-protozoa and antiviral activities of non-cytotoxic truncated and variant analogues of mussel defensin by P. Roch, A. Beschin and E. Bernard. **Evid. Based. Complement. Altern. Med.**, v.1, p.207–9, 2004.
22. CORTE, M.D. et al. Expression and clinical signification of cytosolic hyaluronan levels in invasive breast câncer. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.97, n.3, p.329 – 337, 2006.
23. COSTA, A. F. Farmcognosia. **Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal. 3ºed. VIII**, p.272-273, 2000.
24. CZARNECKA, A.M., CAMPANELLA, C., ZUMMO, G., CAPELLO, F. Mitochondrial chaperones in cancer: From molecular biology to clinical diagnostics. **Cancer Biol Ther.**, v.5, p.7, 2006.
25. DAHLGREN, G. On Dahlgrenograms a system of classification of the angiosperms and its use in mapping characters. **An Acad. Bras. Ci.**, v.67, n.3, p.384-404, 1995.
26. DALLAGO, C.M. et al. Angiogenesis in craniopharyngiomas: Microvascular density and tissue expression of the vascular endothelial growth factor(VEGF) and endostatin. **Endocr. Pathol.**, v.16, n.4, p.355-362, 2005.

27. DENG, B. Column Chromatographic-spectrophotometric Determination of indigo and indirubin in Qing-Dai, A traditional Chinese medicine. Qingdai. **Chung TS' Ao Yao**, v.12, n.6, p.115, 1981.
28. DENG, B. Direct Colorimetric Method for Determination of indigo and indirubin in Qingdai. **Chung TS' Ao Yao**, v.17, n.4, p.163-164, 1986.
29. DOLFINI, E. et al. Method for tissue culture evaluation of the cytotoxic activity of drugs active through the formation of metabolites. **Eur. J. Cancer**, v.5, p.375-8, 1973.
30. DOMINGUES, X.A. et al. Chemical component from *Jiquilite indigofera suffruticosa* Mill. **Planta Medica**, v.34, n.2, p.172-175, 1978.
31. EL-DEIRY, W. S. Role of Oncogenes in resistance and killing by cancer therapeutic agents. **Currents Operacional Oncology, Philadelphia**, v. 9, p.79-87, 1997.
32. FARNSWORTH, N.R.; KAAS, C. J. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. **J. Ethnopharmacol**, v.3, p.85, 1981.
33. FERRAZ, E.M.N. et al. Composição florística em trechos de vegetação da caatinga e brejo de altitude na região do vale do Pajeú. Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, n.1, p.7-15, 1998.
34. GARCEZ, W. S. et al. A nitropropanoyl-glucopyranoside from *Indigofera suffruticosa*. **Phytochemistry**, v.28, n.4, p.1251-1252, 1989.
35. GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; BARISON, A. Additional 3-nitropropanoyl éster of glucose from *Indigofera suffruticosa* (Leguminosae). **Biochemical Sytematics and Ecology**, v.10, n.6, p.20-22, 2002.
36. 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.

37. GUPTA, M. et al. Antitumor activity and antioxidant role of *Bauhinia racemosa* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Acta Pharmacol Sin**, v.25, n.8, p.1070-1076, 2004.
38. GUSTINE, D.L. Aliphatic nitro compounds in crownvitch: A review. **Grop Sci**, v.19, n.2, p.197-203, 1979.
39. HARBONE, J. B. Phytochemical Methods. **London: Chapman & Hall**, 2^a ed., p.288, 1982.
40. HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem. Pharmacol**, v.32, p.1141, 1983.
41. HAYES, A.W. Principles and Methods of Toxicology, **New York: Raven Press**, 2nd edition, 1989.
42. HORWITZ, S.B. How to make taxol from scratch. **Nature**, v.367, p.593, 1994.
43. INDIRUBIN COOPERATIVE GROUP. Clinical study of indirubin in the treatment of 314 patients with chronic granulocytic leukemia. **Chin. J. Hematol.**, v.1, p.132, 1980.
44. JI, X.J. et al. Studies on the antineoplastic effect and toxicity of synthetic indirubin. **Acta. Pharm. Sin.**, v.16, p.146-148, 1981.
45. JOSE, J.K., KUTTAN, G., KUTTAN, R. Antitumour activity of *Embllica officinalis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, p.65-69, 2001.
46. JOSÉ NETO, B.D. et al. Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.21, n.1, p.18-22, 2001.
47. KAMAL, R.; MANGLA, M. *In vivo In vitro*, Investigation on retenoids from *Indigofera suffruticosa* and their biofficacy against the larvas of *Anopheles stephensi* and adults of *Callosobruchus chinesis*. **J Biosc.**, v.18, n.1, p.93-110, 1993.

48. KAPADIA, G.J. et al. Inhibition of Epstein-Barr virus early antigen activation promoted by 12-*O*-tetradecnoylphorbol-13-acetate by the non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Cancer Lett.**, v.161, n.2, p.221-229, 2000.
49. KAWAKUBO, Y. et al. Histopathological studies on antitumor effect of sporamycin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 5, p. 113-118, 1980.
50. KINGSTON, D.G.I. The chemistry of taxol. **Pharmac. Ther.**, v.52, n.1, p. 1-34, 1991.
51. KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. **Gann**, v. 73, p.85-90, 1982.
52. LEITE, S.P. et al. Anti-inflammatory Activity of *Indigofera suffruticosa* extract. **Revbrasa**, v.7, n.1, p.47-52, 2003.
53. LEITE, S.P. et al. Embryotoxicity *in vitro* with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. **Reproductive Toxicology**, v.18, n.5, p.701-705, 2004.
54. LEITE, S.P. et al. Antimicrobial Activity of *Indigofera Suffruticosa*. **eCAM**, v. 3, n.2, p.261-265, 2006.
55. LEITE, S.P. *Indigofera Suffruticosa* Mill: ensaio fitoquímico e ações biológicas biológicas. **Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa, 2003.
56. LIU, C.X.; HE, W.G. Leukogenic effect of complex indigo powder. **Journal of Ethnopharmacology**, v.34, n.1, p.83-86, 1991.
57. 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.

58. MAIER, W.; SCHUMANN, B.; GROGER, D. Biosynthesis of indoxyl in *Isatis tinctoria* and *Polygonum tinctorium*. **Phytochemistry**, v.29, p.817-819, 1990.
59. MAJAK, W. et al. Three nitropopanoyl ester of glucose from *Indigofera linnaei*. **Phytochemistry**, v.31, n.7, p.2393-2395, 1992.
60. MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. **London: Acad. Pres.**, p.52-61, 1982.
61. MARTIN-LORENZO, J.G. et al. Tumores gástricos estromales. Diagnóstico, pronóstico y tratamiento quirúrgico actual. **Cir. Esp.**, v.79, n.1, p.22 – 27, 2006.
62. MATOS, F. J. DE ABREU. Plantas da Medicina popular do Nordeste: propriedades atribuídas e confirmadas. **Fortaleza: Ed. UFC**, p.78, 1999.
63. MCDLOUD, T. et al. Extraction of Bioactive Molecules from Plants. **Proceedings of the International Congress on Natural Products Research**, Park City, UT, 1988.
64. METZ, H. Dünnschichtchromatographische Schnellanalyse bei enzymatischen Steroid-Umsetzungen **Naturwissenschaften**, v.48, p.596, 1961.
65. MEYER, J.J.; AFOLAYAN, A.J.; TAYLOR, M.B.; ENGELBRECHT, L. Inhibition of herpes simplex virus type 1 by aqueous extracts from shoots of *Helichrysum aureonitens* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.52, n.1, p.41-43, 1996.
66. MILLER, R.W.; SMITH, J.R. Seeds of *Indigofera suffruticosa* species: Their content of amino acids that acids that may be deleterious. **J. Agr. Food Chem.**, v.21, n.5, p.909-912, 1973.
67. MINAMI, Y.; KANAFUJI, T.; MIURA, K. Purification and characterization of a β glucosidase from *Polygonum tinctorium* which catalyzes preferentially the hydrolysis of indican. **Biosci.Biotech.Biochem.**, v.60, p.147-149, 1996.

68. MINAMI, Y. et al. Glucosidase in the indigo plant: intracellular localization and tissue specific expression in leaves. **Plant Cell Physiol.**, v.38, p.1069-1074, 1997.
69. MONTELLANO, O. B. Empirical Aztec medicine. **Science**, v.188, p.215, 1975.
70. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
71. NAGY, N. Clinical implication of immunohistochemical markers. **Acta Gastroenterol Belg.**, v.69, n.1, p.52-54, 2006.
72. NAPRALERT – Natural Products Alert, 2003. Illinois University, Chicago. <http://www.uic.edu/pharmacy/depts/PCRPS/NAPRALERT.htm>
73. NASCIMENTO, S.C. Recherche de l'activite antitumorale de produits de synthese ou d'origine naturelle. Utilisation du samba pour l'analyse des modifications cellulaires induites. **Grenoble: Universite Joseph Fourier-Grenoble I.U.F.R. de Pharmacie**, p.173, 1992. Tese de Doutorado.
74. NEU, R. A. New Reagent for Differentiating and Determining Flavones on Paper Chromatograms. **Natuwissenschaften**, v.43, p.82, 1956.
75. OBERBAUM, M. et al. A randomized, controlled trial of the homeopathic medication TRAUMEEL S® in the treatment of chemotherapy induced stomatitis in children undergoing stem cell transplantation. **Cancer**, v. 92, p. 684-690, 2001.
76. O'PESSOA, C. Testes "in vivo" e "in vitro" para avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral de plantas do nordeste brasileiro. **Ceará: Universidade Federal do Ceará**, 1992. Tese de Mestrado.

77. 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). In: **Congresso Nacional de Botânica**, v.38, p.422, 1987, São Paulo.
78. PIO CORREIA, M. Dicionário de plantas úteis no Brasil e das Exóticas cultivadas. **Rio de Janeiro, Imprensa Nacional**, v.1, 1926.
79. RAJKAPOOR, B. et al. Chemoprevention of *N*-nitrosodiethylamine induced phenobarbitol promoted liver tumors in rat by extract of *Indigofera aspalathoides*, **Biol. Pharm. Bull.**, v.28, n.2, p.364-366, 2005.
80. RIBEIRO, I. M. S.; SILVA, M. A.; RANGEL, J. H. A. Levantamento botânico de leguminosas forrageiras nativas da bacia leiteira do Estado de Alagoas. Maceió: EPEAL - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Alagoas, 1984 (Comunicado Técnico).
81. 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.
82. RIET-CORREA, F. Comunicação pessoal. **Pelotas: Lab. Diagnóstico/ UFPel**, 2000.
83. RODRIGUES, O.G. Estudo in vitro para avaliação das alterações morfológicas das células Hep-2, NCIH-292 e TVT canino produzidas por imunoparvum e in vivo para verificação dos seus efeitos terapêuticos. Universidade Federal de Pernambuco, p.127, 2001. Tese de Doutorado.
84. RODRIGUEZ-KÁBANA, R. et al. Bahiagrass for the management of *Meloidogyne arenaria* in peanut. **Annals of Applied Nematology**, v.2, p.110-114, 1988.
85. ROIG, T.; MESA, J.T. Plantas Medicinales, Aromaticas y Venenosas de Cuba. **Habana: Editorial Científico-Técnico**, v.5, p. 163, 1974.

86. ROSSANT, J., VIJH, K.M. Ability of outside cells from preimplantation mouse embryos to form inner cell mass derivatives. **Dev. Biol.**, v.76, p.475-82, 1980.
87. SAWICKI, W., ABRAMCZUK, J., BLATON, O. DNA synthesis in the second and third cell cycles of mouse preimplantation development, a cytophotometric study. **Exp Cell Res.**, v.112, p.199-205, 1978.
88. SHIN, J.H.; LEE, J.H. Cultural conditions and growth characteristics of indigo (*Polygonum tinctorium*) cells in an air-lift bioreactor. **Kor. J. Biotechnol. Bioeng**, v.8, p.193-199, 1993.
89. SHYLES, B.S., PADIKKALA, J. In vitro cytotoxic and antitumor property of *Emilia sonchifolia* (L.) DC in mice. **J Ethnopharmacol**, v.73, p.495-500, 2000.
90. STOCK, C.C. et al. Sarcoma 180 inhibition screening data. **Cancer Research**, v.2, p.179-331, 1955.
91. TANG, Y. Determination of indirubin in Qingdai (*Baphicacanthus cusia* Bremk.) and Chinese medicines containing it. **Chin. J. Pharm. Anal**, v.7, p.40-42, 1987.
92. TARKOWSKI, A.K., WROBLEWSKA, J. Development of blastomeres of mouse eggs isolated at 4 and 8-cell stage. **J Embryol Exp Morphol.**, v.18 p.155-80, 1967.
93. THANGADURAI, D., VISWANATHAN, M.B., RAMESH, N. Indigoferabietone, a novel abietane diterpenoid from *Indigofera longeracemosa* with potential antituberculous and antibacterial activity. **Pharmazie**, v.57, n.10, p.714-5, 2002.
94. 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.

95. VIEIRA, J.R.C.; SOUZA, I.A.; NASCIMENTO, S.C.; LEITE, S.P. *Indigofera suffruticosa*: an alternative anticancer therapy. **eCAM**, p.1-5. 2006.
96. WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E.M. Drogenanalyse. **Berlin: Springer-Verlag**, p.164, 1984.
97. 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.
98. WEISENTHAL, L.M. et al. A novel dye exclusion method for testing in vitro chemosensitivity of human tumors. **Cancer Research XVI**, v.43, p.749-757, 1983.
99. WILLIAMS, M.C. Nitro Compounds in *Indigofera* Species. **Agron. I**, v.73, n.3, p.434-6, 1991.
100. ZUCKERBERG, C. Ultraestrutura of Sarcoma 180. **Cancer Research, Philadelphia**, v. 33, p. 2278-2282, 1973.