



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

IVANISE BRITO DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TOXICOLÓGICA E ANTIMICROBIANA
DOS COMPOSTOS: INDICAN (SINTÉTICO E NATURAL) E INDIGÓIDES DE
FOLHAS DE *INDIGOFERA SUFFRUTICOSA* (FABACEA)**

Recife

2015

IVANISE BRITO DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TOXICOLOGICA E ANTIMICROBINA
DOS COMPOSTOS: INDICAN (SINTÉTICO E NATURAL) E INDIGÓIDES DE
FOLHAS DE *INDIGOFERA SUFFRUTICOSA* (FABACEA)**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica da Universidade
Federal de Pernambuco, para a
obtenção do Título de Mestre em
Inovação Terapêutica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paloma Lys de
Medeiros

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Sônia Pereira

Recife

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Ivanise Brito da

Investigação das atividades toxicológica e antimicrobiana dos compostos: indican (sintético e natural) e indigóides de folhas suffructicosa (Fabacea)/ Ivanise Brito da Silva– Recife: O Autor, 2015.

64 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Paloma Lys de Medeiros

Coorientadora: Sônia Pereira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui bibliografia

1. Plantas medicinais 2. Química vegetal 3. Leguminosa I. Medeiros, Paloma Lys (orientadora) II. Pereira, Sônia (coorientadora) III. Título

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2015-201

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Silva, Ivanise Brito

Título: INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TOXICOLOGICA E
ANTIMICROBINA DOS COMPOSTOS: INDICAN (SINTÉTICO E NATURAL) E
INDIGÓIDES DE FOLHAS DE *INDIGOFERA SUFFRUTICOSA* (FABACEA)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para
obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 22/06 /2015

Banca Examinadora

Profa. Dr^a Paloma Lys de Medeiros

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Prof.Dr. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

Instituição: Universidade federal de Pernambuco

Assinatura: _____

Profa. Dr^a. Roberta Maria Pereira Leite de Lima

Instituição: Centro Universitário Maurício de Nassau

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Profa. Dr^a. Maria Eduarda de Larrazábal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof^a. Dr^a. Maira Galdino Da Rocha Pitta

**VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

A Deus, que nunca me desamparou;

Aos meus pais, por serem minha fortaleza;

Aos amigos que tantas vezes me incentivaram e acreditaram em mim;

A minha família, em especial as irmãs Ana Nadja e Niedja Paula;

À professora Sônia, por tudo que fez por mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a luz que guia meu caminho e a força que me impulsiona todas as vezes que preciso. E por manter sempre perto todos os irmãos de luz

Aos meus pais, Severino Ricardo da Silva e Emília Alves de Brito, por estarem sempre do meu lado e terem me dado à oportunidade de estar no mundo.

A meus irmãos que sempre me ajudaram.

À professora Dr^a Sônia Pereira Leite, pelo acolhimento e por mostrar-me a beleza do mundo científico.

À orientadora Dr^a Paloma Medeiros por acreditar que seria possível.

A todos os companheiros do laboratório: Izabela Rangel, Jeymesson Raphael, Marllon Alex, Tainá Maria. Obrigada por estarem sempre por perto!

À professora Dr^a Claudia Sampaio de Andrade Lima por estar sempre disposta a ajudar.

Ao técnico de laboratório Dewson Rocha Pereira, pelo auxílio, paciência e por tudo que me ensinou.

À professora Dr^a Ivone Antônia de Souza, com quem tanto aprendi.

À professora Dr^a Edeltrudes de Oliveira Lima, pelo acolhimento e disponibilidade.

Ao Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas - Centro de Ciências da Saúde – UFPB, pela possibilidade de desenvolver meu trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica pela oportunidade de realizar um sonho.

Ao funcionário Paulo Germano, pela atenção, ajuda e paciência.

A CAPES pelo auxílio financeiro concedido

À Universidade Federal de Pernambuco, onde pude desenvolver e realizar meu trabalho.

Tudo isso não teria sentido sem vocês!!!

“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor”.

Johann Goethe

RESUMO

O Indican é o precursor de pigmentos indigóides, presente em plantas do gênero indigofera, fungos e urina humana. Este trabalho objetivou investigar as atividades toxicológica e antimicrobiana dos compostos Indican (sintético e natural) e dos indigóides: Índigo e Indirubina de folhas de *Indigofera suffruticosa* (fabacea). Nesta pesquisa foi utilizado o Indican sintético e natural e os derivados indigóides obtidos de folhas de *I. suffruticosa*. No ensaio toxicológico utilizou-se o microcrustáceo *Artemia salina* e na atividade antimicrobiana bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e fungos (leveduras e dermatófitos) através do método de microdiluição em poços. O Indican sintético foi avaliado frente *A. salina* e cepas bacterianas e fungicas e o Indican natural sobre *A. salina* e dermatofitos. Os indigóides Índigo e indirubina de *I. suffruticosa* foram testados sobre dermatofitos. O Indican® e Indican natural de *I. suffruticosa* apresentaram baixa ordem de toxicidade frente à *Artemia salina*. O Indican® não apresentou atividade sobre bactérias *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Indican® frente a leveduras foi: 256 µg/mL para *Candida albicans* e *C. krusei* e 512 µg/mL para *C. tropicalis*, também foi determinada a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do composto frente a essas cepas, obtendo-se 512 µg/mL para *C. tropicalis* e *C. krusei* e 1024µg/mL para *C. albicans*. A CIM do Indican® sintético frente aos dermatófitos: *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Microsporum gypseum* foi 512 µg/mL. O Índigo e o Indican natural de *I. suffruticosa* apresentaram CIM de 256 e 1024 µg/mL respectivamente, frente as cepas de dermatófitos, enquanto a Indirubina não apresentou atividade. Este estudo sugere que o composto Indican® e natural e o alcaloide indigóide: Índigo de *I. suffruticosa* podem ser utilizados no tratamento alternativo nas dermatites.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Indican. Indigóide Toxicidade.

ABSTRACT

The Indican is the precursor of indigóides pigments present in the genre indigofera plants, fungi and human urine. This study aimed to investigate the toxicological and antimicrobial activities of Indican compounds (synthetic and natural) and indigóides Indigo and Indirubina leaves of *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). In this research we used the synthetic and natural Indican and indigóides derivatives obtained from leaves of *I. suffruticosa*. In the toxicological test we used the microcrustacean *Artemia salina* and antimicrobial activity in bacteria (gram positive and gram negative) and fungi (yeasts and dermatophytes) through the wells in microdilution method. Synthetic Indican was rated ahead *A. salina* and bacterial and fungal strains and natural Indican on *A. salina* and dermatophytes. The indigóides Indigo and indirubina of *I. suffruticosa* were tested on dermatophytes. The Indican® and natural Indican *I. suffruticosa* showed low order of toxicity on *Artemia salina*. The Indican® showed no activity against *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of Indican® against yeasts was 256 ug / ml for *Candida albicans* and *C. krusei* and 512 ug / ml for *C. tropicalis*, it was also determined Minimum Fungicidal Concentration (MFC) against the compound these strains, yielding 512 g / ml for *C. tropicalis* and *C. krusei* and 1024µg / ml for *C. albicans*. The CIM synthetic Indican® front of dermatophytes: *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* and *Microsporum gypseum* was 512 mg / mL. The Indigo and natural Indican of *I. suffruticosa* showed MIC 256 and 1024 mg / mL respectively, compared strains of dermatophytes, while Indirubina showed no activity. This study suggests that Indican® and natural alkaloid compound and indigoid: Indigo *I. suffruticosa* can be used as an alternative treatment in dermatitis.

Keywords: Antimicrobial activity. Indican. Indigoide. Toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho esquemático da <i>I. suffruticosa</i> .	22
Figura 2: <i>I. suffruticosa</i> .	22
Figura 3: Transformação química do Indican em Índigo e indirubina.	23
Figura 4. <i>A. salina</i>	26
Figura 5. Fração contendo Indican	42
Figura 6. Indigóides de folhas de <i>I. suffruticosa</i> . 2- Índigo; 3- Indirubina.	42
Figura 7. Padrão do Indican	43
Figura 8. Cromatograma do extrato metanólico de folhas de <i>I. suffruticosa</i> . 1 – Índigo/ 2- Indirubina	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fármacos comerciais de origem vegetal.	21
Tabela 2- Efeito Toxicológico do Indican [®] sobre <i>A. salina</i>	44
Tabela 3- Efeito Toxicológico do Indican natural de folhas de <i>I. suffruticosa</i> sobre <i>A. salina</i> .	44
Tabela 4 - Atividade Antibacteriana do composto Indican [®] - Técnica de microdiluição.	45
Tabela 5: Atividade Antifúngica do composto Indican [®] sobre cepas do gênero <i>Candida</i> .	47
Tabela 6- Concentração Inibitória Mínima – CIM ($\mu\text{g/mL}$) do Indican [®] sobre leveduras - Técnica de microdiluição.	47
Tabela 7- Concentração Fungicida Mínima – CFM ($\mu\text{g/mL}$) do composto Indican [®] sobre leveduras - Técnica de microdiluição.	48
Tabela 8: Concentração Fungicida Mínima ($\mu\text{g /mL}$) do composto Indican [®] sobre dermatófitos.	48
Tabela 9- Concentração Inibitória Mínima - CIM ($\mu\text{g/mL}$) do composto Indican de <i>I. suffruticosa</i> sobre dermatófitos	49
Tabela 10 - CIM ($\mu\text{g/mL}$) do Índigo de <i>I. suffruticosa</i> sobre dermatófitos.	50
Tabela 11- Concentração Inibitória Mínima - CIM ($\mu\text{g/mL}$) da Indirubina de folhas de <i>I. suffruticosa</i> sobre dermatófitos.	51

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

a.C - Antes de Cristo

AN - Agar Nutriente

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - American Type Culture Collection

CDKs - Quinases dependentes de ciclinas

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

Erg A - Esqualeno Epoxidase

IFN γ - Interferon-gama

IC₅₀ - Concentração Inibitória

IL-1- Interleucina 1

ISO - International Organization of Standardization

MTC - Medicina Tradicional e Complementar

OMS - Organização Mundial e Saúde

PNPIC - Práticas Integrativas e Complementares

PPM - Partes por Milhão

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

RF - Índice de retenção

SARM - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

UTI - Unidades de Terapia Intensiva

UV - Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

- °C Grau Celsius
- ® Marca Registrada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1. Geral	19
2.2. Específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Plantas Medicinais	20
3.2 Indigofera suffruticosa.....	22
3.2.1 Fitoquímica	23
3.2.1 Indican	24
3.2.2 Índigo	24
3.2.3 Indirubina	25
3.3 Atividades Biológicas	25
3.3.1 Bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach	25
3.3.2 Atividade Antimicrobiana	26
3.3.3 Resistência Bacteriana	27
3.3.3.1 Staphylococcus aureus.....	28
3.3.3.2 Staphylococcus epidermidis	29
3.3.3.3 Pseudomonas aeruginosa	29
3.3.4 Resistência Fúngica.....	30
3.3.4.1 Candida albicans	31
3.3.4.2 Candida tropicalis	32
3.3.4.3 Candida krusei.....	33
3.3.4.4 Trichophyton rubrum.....	33
3.3.4.5 Trichophyton mentagrophytes	34
3.3.4.6 Microsporum gypseum	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1 Composto sintético Indican	36

4.2 Coleta do material vegetal	36
4.3 Obtenção do extrato metanólico de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	36
4.4 Procedimento cromatográfico	37
4.5 Obtenção dos derivados indigóides de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	37
4.6 Caracterização dos Indigóides: Índigo e Indirubina de Folhas de <i>I. suffruticosa</i>	38
4.7 Ensaio Toxicológico do Indican sintético e natural de folhas de <i>I. suffruticosa</i> sobre <i>Artemia salina</i>	38
4.8 Micro-organismos.....	39
4.9 Meios de Cultura.....	40
4.10 Determinação CIM dos compostos: Indican sintético e natural, Índigo e Indirubina de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	40
4.11 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) do Indican® sobre leveduras	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 Indican, Índigo e Indirubina folhas de <i>I. suffruticosa</i>	42
5.2 Efeito toxicológico dos compostos Indican sintético e natural de folhas de <i>I. suffruticosa</i> sobre <i>A. salina</i>	43
5.3 Atividade antimicrobiana do composto Indican®	45
5.4 Atividade antifúngica do composto sintético Indican® sobre leveduras...	46
5.5 Atividade antifúngica do Indican natural de folhas <i>I. suffruticosa</i>	49
5.6 Atividade antifúngica do Índigo de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	50
5.7 Atividade antifúngica da Indirubina de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	51
6 - CONCLUSÃO	53
6.1 Efeito Toxicológico	53
6.2 Atividade Antimicrobiana.....	53
7 – PERSPECTIVAS.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Indigofera suffruticosa (anil ou anileira) é um arbusto, distribuída em praticamente todo território brasileiro, presente também em países da América, conhecida como anileira, de intenso uso popular (BRAGA, 1976). Estudos com as partes aéreas da planta demonstraram diversas propriedades medicinais (VIEIRA, 1992; MARTINS et al., 2000) como: antiespasmódico, sedativo, estomáquico, emenagôgo e antídoto contra o mercúrio e o arsênio (MARTINS et al., 2000). Sua raiz é febrífuga, diurética, purgativa e insetífuga (VIEIRA, 1992).

A espécie foi usada por mais de cinco mil anos na extração de corantes indigóides, utilizados na indústria têxtil para tingir lã, linho e algodão (ALMEIDA, 2003). Esses compostos são encontrados em plantas, fungos e na urina humana (CALVO, 2007). Além de serem importantes na produção de tintura, também estão presentes na indústria alimentar, produção de cosméticos e indústrias farmacêuticas (ALMEIDA, 2003)

Estudos farmacológicos usando extrato aquoso de *I. suffruticosa* tem mostrado atividade anti-inflamatória (LEITE, 2003), embriotóxica sobre embriões de camundongos (LEITE et al., 2004), antimicrobiana (LEITE, 2006) antitumoral (VIEIRA et al., 2007), Citotóxica (VIEIRA et al., 2007), embriotóxica sobre ovos e larvas de *Aedes aegypti* (VIEIRA, 2011), repelente contra mosquitos *Aedes aegypti* (VIEIRA, 2011). O extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* mostrou excelente atividade contra micro-organismos (LEITE et al., 2006). O composto Indican, isolado de folhas de *I. suffruticosa* apresenta efeito hepatoprotetor e antitumoral (LIMA et al., 2014).

A utilização de plantas medicinais para promoção de tratamento é uma prática comum da humanidade, baseada em conhecimentos empíricos e disseminação de saberes entre as gerações (ARGENTA, et al., 2011). O uso popular de plantas, além contribuir com aspectos culturais e proporcionar a disseminação de conhecimentos, pode revelar indícios das propriedades farmacológicas das mesmas (LÓPEZ, 2006).

Países como o Brasil apresentam uma flora rica, o que estimula a utilização de plantas medicinais, além disso, há acesso facilitado para obtenção das mesmas, uma vez que essas plantas podem ser encontradas em ambientes como mercados públicos, feiras livres e farmácias. Contudo, esse uso apresenta riscos, visto que não

há comprovação da qualidade, ou garantia da autenticidade de alguns produtos comercializados nesses locais (JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). O tratamento alternativo com plantas medicinais é visto pela população como algo menos dispendioso e agressivo, quando comparado com fármacos industrializados, o fácil acesso aos materiais vegetais também é um fator importante na utilização dos mesmos (OMS, 2013).

As dermatites causadas por *Staphylococcus aureus*, bactéria gram-positiva, podem ser classificadas como superficiais, invasivas ou tóxicas. Essas bactérias estão presentes na microbiota normal, são consideradas o principal agente causador de infecções de feridas cirúrgicas, além de apresentarem resistência à maioria das cefalosporinas e penicilinas conhecidas. São micro-organismos resistentes à dessecação e ao frio, apresentam capacidade de colonizar diferentes partes do organismo, como nariz, garganta, intestino, pele, sendo o homem o principal reservatório. Podem causar doenças pela invasão direta dos tecidos, ou liberação de toxinas, originando lesões localizadas ou difusas (SANTOS, et al. 2007; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Fungos dermatófitos são responsáveis por causar micoses, as dermatoses são classificadas de acordo com o local afetado pelo fungo (SANTOS; COELHO; NAPRI, 2002). Esses fungos colonizam regiões que apresentam pelos, pele e unha. As precauções de controle da doença envolvem higiene e tratamento adequado, contudo os fármacos utilizados são tóxicos, e os micro-organismos apresentam resistência. Os fitoterápicos apresentam-se como uma alternativa para lidar com a resistência desses patógenos (VIDAL, 2008).

Considerando a utilização de plantas medicinais como forma terapêutica alternativa e importante no desenvolvimento de novos fármacos, o Laboratório de Cultivo de Células do Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco vem desenvolvendo trabalhos com plantas medicinais da flora nordestina objetivando identificar constituintes químicos e propriedades biológicas. Alguns estudos são desenvolvidos com a *Indigofera suffruticosa* MILL.

. A diversidade de atividades farmacológicas da espécie *I. suffruticosa* e o excelente efeito antimicrobiano do extrato aquoso da referida espécie levou a formulação da hipótese sobre a eficácia terapêutica do indican sintético e natural e dos derivados indigóides desta espécies sobre micro-organismos. Nesse contexto,

objetivou-se investigar o potencial dos compostos: indican (sintético e natural) e dos indigóides de folhas de *I. suffruticosa* sobre o efeito toxicológico e a atividade antimicrobiana.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar o efeito toxicológico e a atividade antimicrobiana do Indican[®] e dos compostos: Indican, Índigo e Indirubina de folhas de *Indigofera suffruticosa*.

2.2. Específicos

2.2.1 Avaliar a ação toxicológica do Indican[®] e do Indican de folhas de *Indigofera suffruticosa* frente à *Artemia salina*.

2.2.2 Estudar o efeito do Indican[®] frente a bactérias e fungos.

2.2.3 Investigar o efeito dos indigóides: Indican, Índigo, e Indirubina de folhas de *Indigofera suffruticosa* frente à dermatófitos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas Medicinais

A utilização de plantas medicinais no tratamento de doenças é uma prática que acompanhando a humanidade desde as civilizações antigas. Havendo relato de uso pelos egípcios, assírios, hebreus, (1600 – a.C), gregos (100 – a.C), chineses (2800 a.C.) (ELDIN & DUNFORD, 2001). As plantas, utilizadas como alimento ou remédio, eram selecionadas através da observação, o que tornava possível a separação das ervas que curavam das que matavam (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006).

A tradição do uso de plantas medicinais é mantida através da difusão de saberes popular. As plantas apresentam-se como alternativa mais econômica e menos agressiva no tratamento das enfermidades. Muitos usuários acreditam que os recursos naturais não podem trazer malefícios a saúde humana (OLIVEIRA; ARAÚJO, 2007). São fatores preocupantes na utilização das plantas medicinais aspectos relacionados com: pouco conhecimento sobre seus efeitos tóxico e propriedades medicinais, consumo concomitante com medicamentos alopáticos, dificuldades na identificação do vegetal (JUNIOR, 2008).

No Brasil, a utilização de plantas com finalidade terapêutica teve influência das culturas indígena, africana e europeia. Sendo o primeiro relato da utilização de plantas medicinais como remédio datado de 1587 - Tratado descritivo do Brasil, escrito por Gabriel Soares de Souza. Esse trabalho apresentava os produtos medicinais utilizados pelos índios (TOMAZZONI; NEGRELLE; CENTA, 2006; ARGENTA, et al., 2011).

A Organização Mundial e Saúde (OMS) reconhece o uso das plantas como tratamento alternativo, principalmente para países em desenvolvimento. Recentemente o órgão publicou um documento regulamentando os profissionais, práticas e produtos da Medicina Tradicional e Complementar – (MTC). A utilização de plantas e materiais vegetais está inserida nesse documento, contudo, os Estados ficam responsáveis por garantir o uso correto e seguro para a população, de forma

que seja possível alcançar o efeito terapêutico sem causar danos à saúde (OMS, 2013).

O Brasil apresenta uma política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC), aprovada em 2006, e uma Resolução de Diretoria Colegiada - RDC de 2010, que dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). São formas de regulamentar e controlar o uso de plantas e fitoterápicos, possibilitando assim segurança para os usuários (BRASIL, 2010). O Ministério da saúde também elaborou uma lista com 71 plantas que apresentam potencial para gerar produtos de interesse para o SUS, baseado em conhecimento e uso popular (BRASIL, 2009).

É possível citar exemplos como o curare, identificado em uma planta em 1783, porém seu constituinte químico foi isolado apenas no século XIX. O ópio, matéria prima da morfina, apresenta relatos de uso em 4000 a.C., a descoberta dos salicilatos oriundos da *Salix Alba*, também representou um marco importante para a indústria farmacêutica (ALVES, 2001), entre tantas outras drogas. A tabela 1 apresenta alguns medicamentos oriundos de plantas medicinais.

Tabela 1: Fármacos comerciais de origem vegetal.

Planta	Classe Química	Fármaco
<i>Salix Alba</i>	Éster	Aspirina®
<i>Atropa belladonna</i>	Alcaloide	Atropina®
<i>Pilocarpus microphyllus</i>	Alcaloide	Pilocarpina®
<i>Artemisininina annua L.</i>	Lactona	Artemisininina®
<i>Taxus brevifolia</i>	Diterpeno	Taxol®
<i>Papaver somniferum L</i>	Alcaloide	Morfina®
<i>Hypericum perforatum</i>	Floroglucinol	Triativ®
<i>Digitalis purpurea L</i>	Quinina	Mefloquina®
<i>Rauwolfia serpentina</i>	Alcaloide	Reserpina®
<i>Catha edulis</i>	Alcaloide	Anfetamina®
<i>Galanthus nivalis</i>	Alcaloide	Galantamina®
<i>Catharanthus roseus</i>	Alcalóide	Velban®

3.2 *Indigofera suffruticosa*

O gênero *Indigofera*, pertence à família Fabacea, foi descrito a primeira vez por Linnaeus em 1737, apresenta aproximadamente 700 espécies (LEWIS; ELIAS, 1981) distribuídas em regiões tropical e subtropical. No Brasil há 15 espécies de *Indigofera*, podendo ser encontradas nos estados de Pernambuco, Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia, São Paulo, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Mato Grosso, Paraná e algumas espécies são encontradas em todo território brasileiro (MOURA, VILEGAS, SANTOS, 2011; FILHO, 2009).

A *Indigofera suffruticosa*, é a espécie mais amplamente distribuída do gênero, presente no Brasil e em outros países da América, desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. Originária da Índia apresenta-se como arbusto ou subarbusto ereto e ramificado podendo alcançar até 2,5m de altura. Caracteriza-se pela presença de tricomas bifurcados e retos, folhas folioladas, pecíolos presentes, folíolos opostos e fruto acentuadamente curvo, cilíndrico com 3 a 7 sementes (MIRANDA, 2006).

A espécie foi introduzida no Brasil e cultivada para a extração do corante anil natural, utilizado na indústria têxtil, considerado o mais importante corante azul para a humanidade desde a época pré-histórica. Na década de 80 foi substituído pelo anil produzido artificialmente (PONTUAL, 2006; SALVADOR et al., 2010).



Figura 1: Desenho esquemático da *I. suffruticosa*. Fonte: Pontual, 2006.



Figura 2: *I. suffruticosa*. Fonte: Autor, 2013.

A planta é utilizada pela população para tratamento de processos infecciosos, inflamatórios, distúrbios circulatórios e afecções das vias respiratórias (MARANHÃO, 2008). A literatura apresenta estudos que comprovam algumas propriedades farmacológicas dos órgãos vegetativos da *I. suffruticosa*, evidenciando efeitos antiespasmódico, sedativo, estomáquico, emenagôgo e antídoto contra o mercúrio e o arsênio (MARTINS, et al., 2000), febrífuga, diurética, purgativa e insetífuga (VIEIRA, 1992), anti-inflamatória, antiparasitária, antimicrobiana, embriotóxica, antitumoral (LEITE, et al., 2003, 2004, 2006; VIEIRA, 2007), hipoglicemiante e hipocolesterolêmico (CAMPOS, et al. 2009).

3.2.1 Fitoquímica

A análise fitoquímica da planta revela a presença de diversas classes químicas como alcaloides bis-indólicos, flavonoides, esteroides, proteínas, carboidratos (LEITE, 2006; VIEIRA, 2011). A planta apresenta em suas folhas o composto indican que sofre hidrólise enzimática para formar o Indoxil, posteriormente oxidado pelo ar originando índigo blue. O Indoxil também origina isantina, que ao condensar-se com o indoxil produz indirubina, um isômero do índigo de coloração rósea (SALAS, 2005).

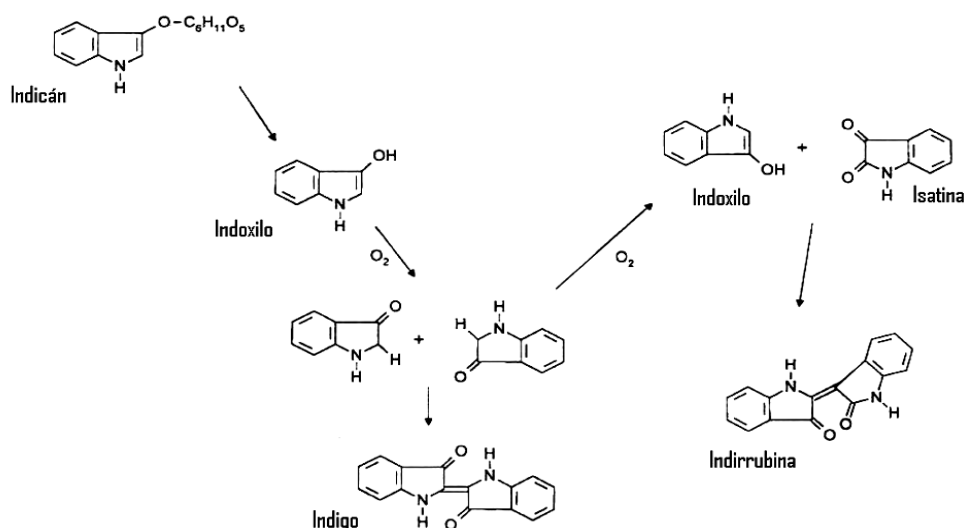


Figura 3: Transformação química do Indican em índigo e indirubina. Fonte: Salas, 2005.

3.2.1 Indican

Plantas do gênero *Indigofera* (Índigo) e *Polygonum* apresentam o composto incolor Indican (índoxil β -D-glicosídeo), que sofre hidrólise por uma enzima β -glicosidase liberando um glicosídeo e uma molécula índoxil, molécula presente na rota de síntese dos compostos: índigo e indirubina (SALAS, 2005).

O papel fisiológico do indican nas plantas não está bem determinado, estudos sugerem mecanismos de defesa da planta contra ataque de herbívoros ou insetos (MINAMI; KANAFUJI; MIURA, 1996).

Maranhão (2008) evidenciou o efeito desse composto sobre linhagens celulares, demonstrando inibição do crescimento celular em camundongos portadores de Sarcoma 180, Lima e colaboradores (2014) sugerem que o mesmo apresenta atividade anticancerígena e hepatoprotetora.

3.2.2 Índigo

Índigo é um antigo corante natural usado pelo homem, é obtido por fermentação a partir de uma grande variedade de plantas e algumas espécies de moluscos. No final do século 19 o Índigo sintético substituiu o índigo natural (SANDOVAL, et al., 2010).

Índigo é um alcaloide bis-indólicos formado a partir da oxidação do indican. O composto é praticamente insolúvel em água e solúvel em compostos orgânicos como anilina, nitrobenzeno, ácido acético glacial e o ácido sulfúrico concentrado (SALAS, 2005).

O índigo é empregado na medicina popular chinesa, apresenta ação anti-inflamatória, antioxidante e antimitótica (CARVALHO, et al., 2010). Alguns autores relataram que índigo e indirubina apresentam potenciais aplicações medicinais tais como agentes antibacterianos, anti-câncer e anti-inflamatório (SUZUKY, et al., 2005). Lin e colaboradores (2012) evidenciaram a ação do óleo de índigo no tratamento de psoríase de placa, demonstrando que houve redução das placas nos pacientes que fizeram uso tópico.

3.2.3 Indirubina

Indirubina é um corante púrpuro, extraídos de plantas tais como *Polygonum tinctorium* Lour e *Indigofera tinctoria*. A indirubina é usada na medicina tradicional chinesa para tratar doenças crônicas. Há na literatura relato das propriedades farmacológicas dessa molécula, destacando atividade antileucêmicas através da inibição de Ciclinas Dependentes de Quinases (CDKs) e anti-inflamatórias, pela inibição da produção do interferon-gama (IFN γ) (KUNIKATA et al., 2000; STERITI, 2002).

Outras atividades farmacológicas de derivados sintéticos da indirubina também são relatadas, como inibição de HIV-1 (HEREDIA et al., 2005), tratamento de enfermidades autoimunes, atividades antiviral, anti-inflamatória (ZHANG et al., 2007).

3.3 Atividades Biológicas

3.3.1 Bioensaio com *Artemia salina* Leach

Os bioensaios utilizando organismos menores, como microcrustáceos, são importantes na verificação da qualidade de produtos naturais ou sintéticos. O teste utilizando *Artemia salina* L. é um exemplo de bioensaio bastante conhecido. *A. salina* é um microcrustáceo, que apresenta alta sensibilidade a compostos naturais. Seu uso se dá pela facilidade de realização e precisão dos resultados, sendo tão confiáveis ou até mesmo melhores que os realizados com linhagens celulares. Esse ensaio é realizado, principalmente, quando deseja-se avaliar toxicidade e/ou concentração letal de extratos ou compostos que apresentam potencial biológico (MACIEL, et al., 2002).

Os ovos desse microcrustáceo podem ser armazenados a temperatura ambiente, mantendo-se viáveis por anos. Quando colocados para eclodir, em água marinha, são necessárias apenas 24 ou 48 horas para obtenção de grande quantidade de larvas (CEPLEANU, 1993). Parra e colaboradores (2001) evidenciaram em seu estudo a capacidade de predição de toxicidade *in vivo* do

método *A. salina*, onde correlacionaram os resultados de toxicidade de 20 extratos testados em ratos e no microcrustáceo, obtendo resultados semelhantes.

A preocupação crescente com o bem-estar dos animais e a redução dos mesmos na realização de testes pré-clínicos, evidencia a necessidade de ensaios alternativos que apresentem segurança e eficácia comprovadas. Na literatura há vários estudos que utilizam *Artemia* como pré-ensaio para teste de toxicidade com extratos e substâncias isoladas, com objetivo de testar citotoxicidade e evidenciar moléculas promissoras para a indústria farmacêutica (HARADA, 2009).

Ensaio utilizando *A. salina* é um parâmetro útil no monitoramento de compostos bioativos, evitando assim, a necessidade de testes mais caros ou que utilizam grande quantidade de animais vertebrados. Além disso, esse teste também pode ser utilizado para outras avaliações biológicas e ambientais (CEPLEANU, 1993; HARADA, 2009).



Figura 4. *A. salina*. Fonte: Web <http://worldaquarium.ru/artemiya-salina/>

3.3.2 Atividade Antimicrobiana

O avanço nas pesquisas clínicas tem proporcionado a pacientes graves uma sobrevida maior, contudo esses pacientes apresentam-se muitas vezes imunodeprimidos, criando assim uma susceptibilidade maior para o desenvolvimento de infecções fúngicas, virais e bacterianas. Apesar da descoberta de novos fármacos para tratamento dessas infecções, é preciso lidar na clínica com a

resistência que os micro-organismos desenvolvem aos tratamentos rotineiros (SANTOS, et al., 2007).

Pesquisas visando à descoberta de fármacos alternativos para tratar infecções causadas por cepas multirresistentes fazem-se necessárias. As plantas medicinais apresentam um papel importante nesse contexto, posto que já são utilizadas pela população e apresentam-se como uma forma de tratamento econômico, principalmente para países em desenvolvimento (NEGRI, et. al., 2014).

A atividade antimicrobiana de extratos naturais e compostos sintéticos e ou isolados de plantas é determinada através da menor concentração necessária capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos testados. O valor encontrado é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI). Aspectos relacionados a ensaios toxicológicos, microbiológicos e legais são relevantes na determinação da CMI (OSTROSKY, et al., 2008).

Existem diversos métodos para avaliar as atividades antibacteriana e antifúngica dos extratos e compostos. Sendo os mais conhecidos: método de difusão em Agar, macrodiluição e microdiluição (OSTROSKY, et al., 2008). A investigação de agentes antimicrobianos apresenta importância clínica, considerando a necessidade de substâncias menos tóxicas e mais eficazes contra resistência dos micro-organismos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

3.3.3 Resistência Bacteriana

A resistência bacteriana constitui atualmente um dos problemas mais importantes das doenças infecciosas. Na clínica, esse problema está relacionado a tratamentos inadequados e utilização indiscriminada de antibióticos. Acarreta altas taxas de mortalidade, principalmente quando as infecções são causadas por agentes etiológicos como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes (GÓMEZ; VÁZQUEZ; GÓMEZ, 2008).

A resistência está relacionada diretamente com a capacidade do micro-organismo de crescer na presença de um antibiótico. As bactérias lançam mão de vários mecanismos para garantir seu crescimento na presença dos antibióticos, entre eles pode-se citar: inativação enzimática, alterações na permeabilidade da

parede celular, alterações dos precursores da parede celular entre outros (CALVO, et al. 2006).

Até o século XXI a resistência bacteriana ocorria predominantemente em ambientes hospitalares, atingindo pacientes debilitados. Atualmente, está associada a diversos ambientes podendo, inclusive, comprometer indivíduos saudáveis. Há uma preocupação da indústria farmacêutica, no desenvolvimento de fármacos efetivos contra esses patógenos multirresistentes. Nesse contexto de busca por novas drogas, os produtos naturais apresentam-se como alternativa terapêutica promissora (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

3.3.3.1 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus estão presentes na pele e no trato respiratório em pessoas saudáveis, contudo podem tornar-se patogênicos quando há ruptura da barreira cutânea ou queda da imunidade (GELATTI, et al., 2009). O gênero *Staphylococcus* é composto de 33 espécies, sendo o *S. aureus* o mais patogênico para a espécie humana. São cocos Gram-positivos, catalase positivos que formam arranjos semelhantes a "cachos de uva", anaeróbios facultativos (NETTO, et al., 2001).

A característica isolada mais importante para classificar o gênero *Staphylococcus* é determinada pela prova da coagulase, que avalia a capacidade de produção da enzima. Bactérias que produzem coagulase podem promover uma reação de coagulação, *S. aureus* são coagulase positivos (RATTI; SOUSA, 2009). Essa espécie pode ocasionar infecções cutâneas, incluindo foliculite simples, impetigo, furúnculos ou infecções sistêmicas levando a septicemia, endocardite e outras complicações (NETTO, et al, 2001).

Estudos evidenciam a colonização por *S. aureus* da pele ou mucosa nasal em aproximadamente 80% a 100% dos pacientes com Dermatite Atópica (DA). A DA, também conhecida como eczema, é uma doença inflamatória crônica da pele que causa significativa morbidade em indivíduos afetados. Há correlação entre a gravidade do eczema e a colonização por *S. aureus*, demonstrando que a presença do patógeno está envolvida no agravamento da doença em muitos pacientes (MATSUI, et al., 2000).

A resistência microbiana é um problema para o tratamento de infecções causadas por *S. aureus*. Em 1942, a resistência à penicilina começou a ser descrita, como resultado da produção de penicilinase por algumas cepas. Em 1960, a meticilina foi lançada como uma alternativa terapêutica para as cepas produtoras de penicilinase, no entanto, houve cepas resistentes à meticilina, elas foram chamadas *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (SARM). Em 1980, cepas SARM tornaram-se um problema endêmico em hospitais de diferentes países, incluindo Brasil (SOUSA, 2012).

3.3.3.2 *Staphylococcus epidermidis*

Staphylococcus epidermidis, bactéria gram-positiva, comensal da pele humana. É considerado um importante patógeno, responsável principalmente por infecções associadas à utilização de cateteres de longa permanência. Infecções dos olhos, ouvidos, nariz, garganta e cardiovasculares também são causadas por esse agente (VUONG, et al., 2003).

As mudanças nas práticas e tratamentos médicos das últimas décadas, têm resultado no surgimento de *S. epidermidis* como uma das principais causas de bacteremia nosocomial. Essa tendência está ligada principalmente a fatores como: uso cada vez maior de dispositivos invasivos, imunodeficiência dos pacientes hospitalizados e uso indiscriminado de antibióticos, que acabam gerando cepas multirresistentes (RAAD, et al., 1998).

A patogenicidade das infecções causadas por essa espécie está associada à capacidade de colonização dos dispositivos médicos e formação de biofilmes. A aglomeração multicelular na formação do biofilme é um fator que dificulta a erradicação do patógeno, visto que essa conformação favorece a resistência intrínseca a antibióticos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (RODRIGUES, 2011).

3.3.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, responsável por infecções hospitalares com altas taxas de morbidade e mortalidade. Apresenta

capacidade de crescer em ambientes adversos, e possui diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos (LIVERMORE, 2002).

É um agente oportunista, sua patogênese está associada às condições imunológicas do hospedeiro. A capacidade invasiva e toxigênica determina a patogênese, sendo possível determinar três fases no processo de infecção causada por esse organismo: 1) adesão e colonização, 2) invasão local, 3) disseminação sistêmica (NETTO, 2003).

Pseudomonas aeruginosa está presente na flora bacteriana do indivíduo sadio. Em pacientes hospitalizados, a bactéria torna-se patogênica, podendo alcançar taxas de colonização gastrointestinal de 50%, sendo encontrada principalmente em pacientes imunocomprometidos, como: grandes queimados, cirurgiados e os tratados com ventilação mecânica (FLAHERTY;STOSOR, 2004).

É considerada a espécie mais virulenta entre as bactérias Gram-negativas não fermentadoras. Pode causar síndrome séptica no hospedeiro, através da liberação de mediadores vasoativos como interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral. Apresenta diferentes mecanismos de defesa, o que acaba conferindo resistência a agentes antibacterianos como β -lactâmicos, tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglicosídeos (SOARES, 2005).

3.3.4 Resistência Fúngica

O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é limitado. A anfotericina B e os azóis - principalmente cetoconazol, fluconazol e itraconazol - são atualmente os fármacos de primeira escolha. Contudo a utilização desses fármacos apresenta problemas relacionados à potência, segurança, propriedades farmacocinéticas e resistência, o que evidencia a necessidade de novas drogas mais eficazes e seguras (BERGOLD;GEORGIADIS, 2004).

A resistência aos antifúngicos é um grande desafio para a clínica frente às dificuldades do tratamento das micoses, sendo sugerido quando possível, o isolamento do agente infeccioso e a determinação da CIM das possíveis drogas utilizadas no tratamento (COLOMBO, 2003).

Assim como os antibióticos, o uso cada vez maior de agentes antifúngicos, aliado a tratamentos inadequados, são responsáveis por favorecer a resistência desses patógenos aos fármacos utilizados na rotina médica. A dificuldade em encontrar medicamentos ativos tem levado a uma busca por drogas mais potentes, contudo essas drogas apresentam efeitos colaterais mais acentuados (CASTRO, et al, 2006).

Peres e colaboradores (2010) evidenciaram em seu trabalho, os mecanismos relacionados à resistência de dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Destacando estratégias utilizadas por esses fungos como: participação de modificadores de enzimas alvo, superexpressão de proteínas, adaptação ao estresse, mutação no gene que codifica a enzima esqualeno epoxidase (Erg A) entre outros.

O gênero *Candida*, responsável por infecções locais e sistêmicas, apresenta as espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* e *C. guilliermondii* como os agentes mais patogênicos. Esses micro-organismos também desenvolveram resistência aos antifúngicos. Valendo-se de mutações ou aumento da expressão de genes, esses patógenos tornaram-se resistentes aos agentes azólicos (MENEZES; MENDES; CUNHA, 2009).

A resistência antifúngica, além de ser um problema que pode ocorrer no tratamento das micoses, promove uma seleção natural de micro-organismos, com isso as infecções por espécies susceptíveis aos antifúngicos estão sendo causadas por cepas mais resistentes (CASTRO, et al., 2006).

3.3.4.1 *Candida albicans*

O gênero *Candida* é responsável por formação de biofilmes em humanos, além de ser capaz de colonizar diferentes tecidos (DELGADILLO, et al. 2013). Essas leveduras são responsáveis por 70 a 90 % de infecções fúngicas invasivas, *Candida* spp. é o quarto grupo mais comum de patógenos nosocomiais isolados de pacientes provenientes de Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e cirúrgicos (RIBEIRO, et al., 2009).

Candida albicans apresenta polimorfismo, o que faz com que a espécie consiga alterar sua forma de acordo com as condições do ambiente, além de

favorecer a colonização de diferentes tecidos (MODRZEWSKA e KURNATOWSKI, 2013). É um fungo oportunista, presente de forma comensal nos tratos gastrointestinal, geniturinário e na flora oral humana (PEIXOTO, et al., 2014).

Esse patógeno causa infecções em organismos imunodeprimidos, podendo ser superficiais, afetando pele e mucosas, ou invadir e disseminar-se no organismo (SPAMPINATO;DÁRIO, 2013). A Candidíase Invasiva (CI) representa a principal infecção fúngica dos seres humanos, causando doença com risco de morte em imunodeprimidos (BUGLI et al., 2013).

A espécie *C. Albicans* é responsável por 50 a 70% das infecções invasivas causadas pelo gênero *Candida*. Estudos demonstram os mecanismos utilizados por esses patógenos para tornarem-se resistentes aos fármacos (PAUL; ROWLEY, 2014). Contudo há um consenso que relaciona a resistência antifúngica a fatores dependentes da interação entre o hospedeiro, droga e fungos (SILVA, et al., 2002).

3.3.4.2 *Candida tropicalis*

C. tropicalis é um patógeno humano oportunista com capacidade de colonizar diferentes locais do corpo, incluindo pele, trato gastrointestinal, geniturinário e vias respiratórias. Pode ser adquirido endogenamente em pacientes imunocomprometidos, através de cateteres de uso prolongado, ou exogenamente pelo contato direto com o patógeno (PRANEENARARAT, 2014).

Essa espécie é considerada a segunda principal responsável por infecções fúngicas em pacientes portadores de câncer, ficando atrás apenas da *C. albicans*. Apresenta relação direta com infecções em pacientes portadores de leucemia. Estudos sugerem que a detecção de enzimas hidrolíticas e a capacidade de formar biofilmes podem estar associadas à capacidade de gerar infecções hematogênicas (DIMITRIOS, et al., 2001).

C. tropicalis tem uma capacidade invasiva maior que a *C. albicans* e estima-se que 50-60% de pacientes com condições predisponentes, quando colonizados, desenvolvem candidíase invasiva, além disso, apresentaram resistência moderada a fluconazol (SOMENZI, 2006).

3.3.4.3 *Candida krusei*

C. krusei é responsável por 2 a 3% de todas as infecções sanguíneas causadas por *Candida*. Estão presentes na colonização e infecção de pacientes portadores de malignidades hematológicas (RIBEIRO, 2009).

C. krusei é um patógeno que apresenta resistência a várias drogas com diminuição na susceptibilidade para fluconazol, anfotericina B e flucitosina (PAPPAS et al. 2009).

Wingard e colaboradores (1991) evidenciaram a presença dessa espécie em pacientes realizaram transplante de medula. Constatou também um aumento na prevalência de *C. Krusei* em pacientes que fizeram uso profilático de Fluconazol no período pré-operatório.

Os mecanismos envolvidos na colonização e invasão dos tecidos são poucos conhecidos. Acredita-se que a resistência ao Fluconazol gera uma seleção dos micro-organismos, onde os mais virulentos conseguem sobreviver e causar infecções mais severas, como as infecções sistêmicas (WINGARD, 2002).

3.3.4.4 *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum é o dermatófito de maior incidência na Europa, e provavelmente o mais comum do mundo, presente em onicomicoses geralmente em crianças, contudo pode aparecer também em diabéticos ou pessoas que apresentam problemas de queratinização (NENOFF, et al., 2014).

A fonte mais comum de infecção é o banho, contudo, também pode ocorrer transmissão horizontal ou vertical. Outras fontes de infecção são chuveiros de academia, vestiários em piscinas públicas (NENOFF, et al., 2012). *T. rubrum* é o principal agente causador de *tinea pedis* e *tinea ungueal* e em menor proporção é o agente responsável por *tinea cruris* e *tinea corporis* (MOYANO, et al., 2008).

Há relatos na literatura que apontam para uma supressão do sistema imune provocada pelo *T. rubrum*, visto que mesmo é capaz de produzir substâncias que diminuem a resposta imune. Além disso, o fungo também é responsável por inibir a proliferação de queratinócitos, retardando a rotatividade epidérmica, permitindo com

isso que a infecção fúngica torne-se mais persistente (WEITZMAN;SUMMERBELL, 1995).

3.3.4.5 *Trichophyton mentagrophytes*

Trichophyton mentagrophytes apresenta subtipos: *T. Mentagrophy var. interdigitale*, *T. Var mentagrophytes*, *T. var. nodulare*, *T. mentagrophytes var. goetzii*, *T. mentagrophytes var. granulosum*. As infecções causadas por esses dermatófitos estão frequentemente associadas com lesões inflamatórias do couro cabeludo, a pele e barba (KAUFMAN et al, 2005).

Estudos demonstram que o *Trichophyton mentagrophytes* é um dermatófito comum isolado em onicomicoses de pacientes idosos (AFSHAR, et al. 2014). *T. mentagrophytes* é responsável por causar infecções que afetam pés, rosto e corpo. A infecção mais conhecida causada por esse micro-organismo é a *Tinea pedis* conhecida como "pé de atleta" (COSTA, 2008).

O tratamento das infecções por dermatófitos deve ser feito de forma a erradicar o material infeccioso dos portadores e do ambiente. Para isso, indica-se cortes dos pelos, isolamento apropriado, medidas sanitárias e terapia farmacológica com administração sistêmica de medicamentos fungicidas ou fungistáticos. Contudo tem-se observado que são necessárias altas doses dos medicamentos o que gera malefícios para os pacientes (FRIAS; KOZUSNY-ANDREANI, 2009).

3.3.4.6 *Microsporum gypseum*

Os dermatófitos colonizam substratos de queratina, como pelos, penas, pele de animal e unhas, este grupo inclui vários espécies dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*. *Microsporum gypseum*, dermatófito geofílico, é uma espécie de alta incidência e baixo potencial contagioso em humanos, presentes em crianças e adultos (MARTOS, et al.,2004)

Infecções causadas por *M. gypseum* são mais comuns em animais do que no homem. A infecção humana acontece através de feridas ou abrasões da pele, que entram em contato com o solo ou animais contaminados (KNOPFEL; TAVITI; DIFONZO, 1991).

Esse patógeno responsável pela infecção *tinea corporis*, o tratamento é realizado com antifúngico sistêmico, com duração de aproximadamente 12 semanas ou mais, a terapia tópica funciona como adjuvante (GLAVAN, et al., 2013). A forma inflamatória da *tinea corporis* é conhecida como Kerion, caracterizada como inflamação dos folículos do couro cabeludo e pele ao redor, com aumento de linfonodos regionais, placa supurativa e dolorosa. O diagnóstico é realizado através de cultura ou histopatologia, é uma infecção confundida na clínica com infecções bacterianas, quando tratado em estágios tardios resultam em cicatriz fibrótica, levando à alopecia e a cicatriz (PEIXOTO, et al., 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Nos ensaios experimentais utilizou-se os compostos Indican (sintético e natural) e os indigóides; Índigo e Indirubina de folhas de *I. suffruticosa* frente a *A. salina* e cepas bacterianas e fúngicas.

4.1 Composto sintético Indican

O composto Indican[®] (Indoxyl β -D-glucoside) foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich[®]

4.2 Coleta do material vegetal

A coleta foi feita na cidade de Igarassu, estado de Pernambuco, nordeste do Brasil, no período da manhã. A espécie *I. suffruticosa* foi coletada 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 - CCB/UFPE onde foi efetuada a herborização. A amostra encontra-se catalogada sob o número 43694 no Herbário do Centro de Ciências Biológicas da UFPE. As folhas foram separadas, pesadas e utilizadas na obtenção do extrato metanólico.

4.3 Obtenção do extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa*

O extrato metanólico foi obtido a partir de 2 kg de folhas frescas recém coletadas, armazenadas a 5°C e trituradas em pequenos fragmentos. Foi realizada extração exaustiva utilizando metanol como solvente orgânico. A maceração foi feita utilizando 2 litros de solvente à temperatura ambiente, durante 72 horas, sendo o

resíduo sólido removido por filtração (VIEIRA, 2011). O solvente do extrato foi removido e rotaevaporado, obteve-se um rendimento final de 15%.

4.4 Procedimento cromatográfico

Aproximadamente 15 µL do extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa* foi submetido à cromatografia em camada delgada (CCD). Foram utilizadas placas prontas de alumínio revestidas com sílica gel marca Merck® e sistema móvel utilizando: 100 v. v. acetato de etila, 2 v.v. acetato fórmico, 2v.v. ácido acético, 2v.v. água. As placas foram reveladas utilizando o revelador Dragendoff e luz ultravioleta (UV) (Vieira, 2011).

4.5 Obtenção dos derivados indigóides de folhas de *I. suffruticosa*

Para obtenção dos indigóides de folhas de *I. suffruticosa* foram utilizados solventes com grau de pureza analítica (PA), placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) marca Merck®. As análises por CCD foram realizadas em cuba saturada com migração ascendente, e Sílica-gel 60F (200g) para empacotamento da coluna usada na separação cromatográfica através de cromatografia em coluna.

O extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa* rotaevaporado (5g) foi submetido à cromatografia de permeação em gel, utilizando Sílica-gel 60F (200g) como fase estacionária e metanol como fase móvel. As frações foram coletadas por semelhança em diferentes tubos de ensaio (n=28 - 10ml cada), monitoradas por CCD, empregando placas prontas em gel de sílica (PPGS) e fase móvel acetato de etila, acetato fórmico, ácido acético, e água (100:11:11:26). As placas foram reveladas em vanilina clorídrica. As frações 10-26 marrons foram positivas o composto Indican.

Após revelação por CCD, O indican foi submetido à Cromatografia de coluna (CC) em Sílica-gel 60F. O Indican (20 mg) foi eluído com diclorometano (CH₂CL₂), coletando-se quarenta e duas (42) frações, também monitoradas por CCD. Onde foi

possível obter os indigóides Índigo (18 mg) e Indirubina (16 mg). A obtenção dos derivados indigóides seguiu o protocolo de isolamento descrito por Vieira (2011) com adaptações.

4.6 Caracterização dos Indigóides: Índigo e Indirubina de Folhas de *I. suffruticosa*

Os Indigóides - Índigo e Indirubina foram caracterizados de acordo com o Índice de Retenção (RF) – Calculado através da razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo eluente (BIAGI, 1974).

$$R_f = \frac{D_c}{D_e}$$

Rf = Índice de Retenção

Dc = Distância Percorrida pelo Composto

De = Distância Percorrida pelo eluente

4.7 Ensaio Toxicológico do Indican sintético e natural de folhas de *I. suffruticosa* sobre *Artemia salina*

A escolha do teste com *A. salina* foi baseada nas normas do Comitê de Ética em Animais, onde sugere-se a utilização de técnicas alternativas, substituindo os animais vertebrados por outros artifícios.

Para realização do bioensaio com *A. salina* foi utilizada a metodologia descrita por Meyer e colaboradores (1982) com adaptações. Os ovos da *A. salina* foram colocados para eclodir em uma cuba contendo água do mar filtrada, na presença de luz com lâmpada de 100 W sendo aerado por um aerador comercial para aquário, o sistema foi mantido a temperatura ambiente durante 48 horas.

Após a eclosão, as larvas foram analisadas quanto à viabilidade (motilidade normal) e separadas em tubos de ensaio (10 mL), contendo 10 náuplios em cada. Utilizou-se um foco de luz para melhor visualização do microcrustáceo, a transferência para o tubo foi feita com o auxílio de uma pipeta Pasteur®. O Indican®

e o Indican de *I. suffruticosa* foram dissolvidos em água marinha, criando uma solução mãe com uma concentração duas vezes maior que a desejada para o teste. A solução contendo Indican® e o Indican de *I. suffruticosa* (2,5 mL) foi adicionado em cada tubo com igual volume de água marinha, fazendo com que as concentrações caíssem pela metade, obtendo nos tubos 400, 200 e 100 ppm. Foi feito um controle positivo com água marinha, os testes foram realizados em quadruplicata.

Os tubos foram mantidos por 24 horas em uma estante, sob temperatura e iluminação ambiente. Após esse período foi feita a leitura do teste, utilizado uma lupa e foco de luz para auxiliar. A vitalidade da *Artemia* foi definida considerando o movimento do microcrustáceo.

4.8 Micro-organismos

Nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana, foram incluídas cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538, LM-289, LM-197), *S. epidermidis* (ATCC-12228) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-25853, LM-16606, P-12) e fúngicas: *Candida albicans* (ATCC-76645, LM-108, LM-P20), *Candida tropicalis* (ATCC-13803, LM-6), *C. krusei* (LM-13, LM-08), *Trichophyton rubrum* (LM-640; 600), *T. mentagrophytes* (LM-02;202) e *Microsporum gypseum* (ATCC-189)

As cepas foram adquiridas no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e no Laboratório de Micologia e de Microbiologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba. As mesmas foram mantidas em meios de cultura apropriados, Agar Nutriente - AN para bactérias e Agar Sabouraud Dextrose - (ASD) para leveduras (DIFCO LABORATORIES/France/USA), conservadas a 4° C e 35° C.

A suspensão dos microrganismos foi preparada conforme o tubo 0.5 da Escala McFarland, ajustada através de leitura espectrofotométrica (Leitz-Photometer 340-800), para 90% T (530 nm), correspondendo, aproximadamente, a 10⁶ UFC/mL (NCCLS, 2000; CLEELAND e SQUIRES, 1991).

4.9 Meios de Cultura

Os ensaios antimicrobianos foram realizados em meio líquido Caldo Nutriente-CN para bactérias (DIFCO LABORATORIES/France/USA) e meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) para leveduras e dermatófitos (ACUMEDIA/India). Os meios de cultura foram preparados e usados conforme as instruções de cada fabricante.

4.10 Determinação CIM dos compostos: Indican sintético e natural, Índigo e Indirubina de folhas de *I.suffruticosa*.

A CIM foi realizada pela técnica de microdiluição em poços em duplicata, utilizando placas de microtitulação contendo 96 cavidades com fundo em forma de “U”. Em cada orifício da placa, foram adicionados 100µL do CN para bactérias e RPMI 1640 para leveduras e dermatófitos, duplamente concentrado. Posteriormente, 100 µL dos compostos: Indican sintético e natural, índigo e Indirubina de folhas de *I. suffruticosa*, também duplamente concentrado, foram dispensados nas cavidades da primeira linha das placas. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa se encontra a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo dos micro-organismos nas cavidades, onde cada coluna da placa referiu-se, especificamente, a uma cepa.

Foi feito controle de crescimento do microrganismo no meio de cultura com Cloranfenicol® (100 µg/mL) para bactérias, Nistatina® (100 UI) para leveduras e Fluconazol® (100 µg/mL) para dermatófitos. As placas foram seladas e incubadas a 35° C por 24 horas para bactérias e leveduras e a temperatura ambiente, 28-30° C por 10 dias, para dermatófitos. No ensaio biológico com as bactérias, após 24 horas de incubação, foi adicionado 20 µL de solução do corante resazurina a 0,01 % (INLAB), conhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN; MARKAN, 1998).

Foi considerada como CIM, a menor concentração capaz de inibir o crescimento das cepas bacterianas usadas nos ensaios, verificado manutenção da coloração do corante indicador. A CIM do produto sobre as cepas fúngicas foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento fúngico verificado nas cavidades, quando comparado com o crescimento controle.

Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CIM obtidas nos dois ensaios (ELOFF, 2009; SOUZA, et al., 2007). A atividade antimicrobiana dos produtos foi interpretada e considerada ativa ou não, conforme os seguintes critérios: 50-500 µg/mL= forte/ótima atividade; 600-1500 µg/mL=moderada atividade; acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al.; 2007).

4.11 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) do Indican® sobre leveduras

Para determinar a CFM, alíquotas de 1 µL da CIM, CIM x 2 e CIM x 4 foram inoculadas em placas contendo Ágar Sabouraud-Dextrose (ASD). Após 48 horas de incubação foi realizada a leitura para avaliar a CFM, com base no crescimento ou não das leveduras. A CFM foi definida como a menor concentração do produto que inibiu o crescimento total ou ocorreu crescimento inferior a três Unidades Formadoras de Colônias (UFC), resultando em 99,9% de atividade fungicida (ERNST et al., 1996; ESPINEL-INGROFF et al., 2002). Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso pela média geométrica dos valores de CFM obtidas nos dois ensaios (CLEELAND & SQUIRES, 1991; ELOFF, 2009).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa* foi submetido a um estudo fitoquímico para obtenção de derivados indigóides. Neste processo extrativo foi utilizada cromatografia de camada delgada e coluna sendo os compostos identificados e caracterizados por valores de índice de retenção (Rf). Os compostos naturais: Indican, Índigo e Indirubina e o Indican sintético foram utilizados nas atividades biológicas.

5.1 Indican, Índigo e Indirubina folhas de *I. suffruticosa*

As figuras 5 e 6 demonstram a obtenção dos compostos: Indican, Índigo e Indirubina a partir do extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa*.

O extrato metanólico (5g) quando submetido à Cromatografia de Coluna (CC) revelou a presença de frações de coloração marron contendo Indican (1- fração com indican), azul (2-Índigo) e rosa (3- indirubina). As quarenta e duas (42) frações foram reunidas e identificadas por CCD.

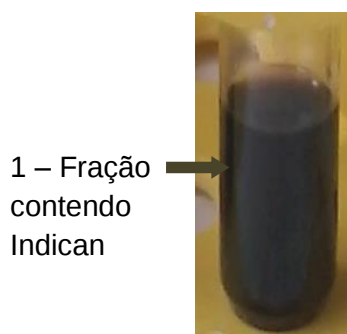


Figura 5. Fração contendo Indican.
Fonte: Autor

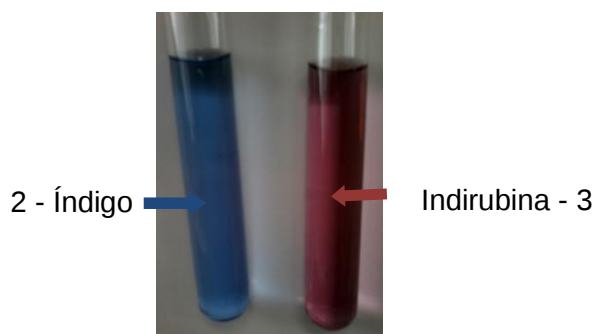


Figura 6. Indigóides de folhas de *I. suffruticosa*. 2- Índigo; 3- Indirubina.
Fonte: Autor

Os cromatogramas revelaram a presença do Indican natural e dos indigóides Índigo e Indirubina (Figuras 7 e 8). Obtendo um rendimento final 20 mg (Indican), 16 mg (Índigo) 18 mg (Indirubina). O derivado Indican foi identificado pela presença de derivados indigóides comparados com o padrão (P), o índigo e indirubina foram identificados e caracterizados através dos valores dos índices de retenção (Rf) 0.75 e 0.5 respectivamente. Nossos dados corroboram com os descritos por Vieira

(2011) que identificou essas mesmas moléculas da espécie *I. suffruticosa* através dos índices de retenção. Recentemente Lima et al (2014) realizou um Estudo fitoquímico do extrato de aquoso de folhas da mesma espécies demonstrando a presença do composto Indican.

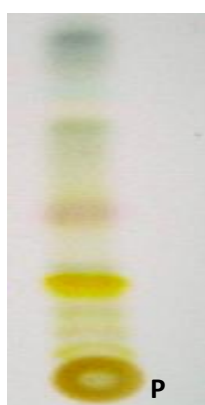


Figura 7. Padrão do Indican.
Fonte: Autor

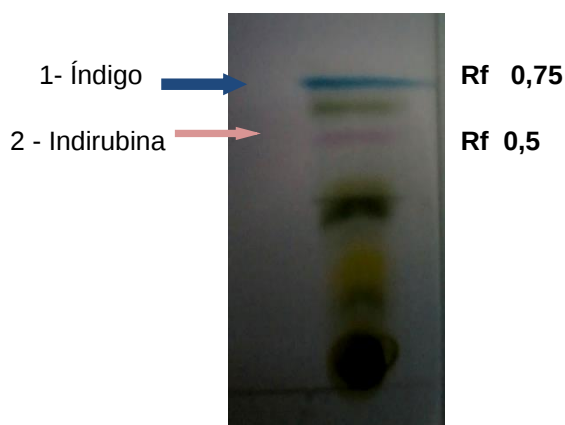


Figura 8. Cromatograma do extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa*. 1 – Índigo/ 2- Indirubina.
Fonte: Autor

I. suffruticosa e *Polygonum tinctorum* são espécies vegetais que são capazes de produzir índigo e indirubina, pois apresentam o metabólito precursor Indican, armazenado nas suas folhas. O armazenamento dessa molécula está relacionado com o grau de maturação e do desenvolvimento de cloroplastos (SANDOVAL; MÉNDEZ; CARDADOR, 2010).

Estudos relatam que a atividade da enzima Beta-glucosidase, responsável por converter Indican em Indoxil, originando posteriormente as moléculas Índigo e indirubina, apresenta mais atividade nas plantas frescas do que nas folhas secas e semi-secas e que a ação dessa enzima diminui com calor e desidratação (CHANAYATH; LHIEOCHAIPHANT; PHUTRAKUL, 2002).

5.2 Efeito toxicológico dos compostos Indican sintético e natural de folhas de *I. suffruticosa* sobre *A. salina*.

Os resultados dos ensaios toxicológicos do indican e o indican de folhas de *I. suffruticosa* estão registrados nas tabelas 2 e 3.

O Indican® e o Indican de folhas de *I. suffruticosa* foram testados nas concentrações 100, 200 e 400 ppm sobre *A. salina*. Os compostos apresentaram baixa ordem de toxicidade com, viabilidade de 99% das larvas de *A. salina* em presença ao composto sintético e 98% das larvas em presença ao Indican de *I. suffruticosa*.

Tabela 2- Efeito Toxicológico do Indican® sobre *A. salina*.

*A. salina	Indican (ppm)		
**Controle	100	200	400
10	10	10	9
10	10	10	10
10	10	10	10
10	10	10	10

** Água do mar; * N – 160 *A. salina*

Tabela 3- Efeito Toxicológico do Indican natural de folhas de *I. suffruticosa* sobre *A. salina*.

*A. salina	Indican de <i>I. suffruticosa</i> (ppm)		
**Controle	100	200	400
10	10	9	10
10	10	10	10
10	10	10	10
10	10	10	9

** Água do mar; * N – 160 *A. salina*.

O ensaio da *A. salina* é utilizado rotineiramente na investigação de efeitos toxicológicos de extratos e substâncias puras. Siqueira e colaboradores (1998) validaram em seu trabalho a confiabilidade do teste com *A. salina*, ao apresentar resultados semelhantes do bioensaio realizado com crustáceo e a toxicidade de substâncias identificadas na literatura como ativas contra células tumorais (MOREIRA, 2003).

Lima et al (2015) demonstrou que o extrato metanólico da casca de *Croton rhamnifolioides* foi testado nas concentrações (500, 250 e 125 µg/mL) sobre *A.*

salina, mostrando a viabilidade de (27,5, 82,5 e 100%) respectivamente. Esse resultado mostra que o extrato metanólico do *Croton rhamnifolioides* apresenta moderada toxicidade (LC₅₀ de 486.59 µg/mL) frente *A. salina*.

Os nossos resultados demonstram que o composto sintético Indican e o indican de folhas de *I. suffruticosa* podem ser bem tolerados no sistema biológico.

5.3 Atividade antimicrobiana do composto Indican®

No processo de avaliação da atividade antimicrobiana do composto Indican®, nas concentrações de 4 a 1024 µg/ml pela técnica de microdiluição, foi observado que o composto não produziu inibição sobre as cepas de *Staphylococcus* e *Pseudomonas*. Os resultados da atividade antimicrobiana, obtidos a partir de Indican®, encontram-se registrado na tabela 4.

Tabela 4 - Atividade Antibacteriana do composto Indican® - Técnica de microdiluição.

Produtos		Micro-organismos						
Indican® µg/mL	<i>S. aureus</i> ATCC-6538	<i>S. aureus</i> LM-289	<i>S. aureus</i> LM-197	<i>S. epidermidis</i> ATCC-12288	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-25853	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-16606	<i>P. aeruginosa</i> LM-12	
1024	+	+	+	+	+	+	+	
512	+	+	+	+	+	+	+	
256	+	+	+	+	+	+	+	
128	+	+	+	+	+	+	+	
64	+	+	+	+	+	+	+	
32	+	+	+	+	+	+	+	
16	+	+	+	+	+	+	+	
8	+	+	+	+	+	+	+	
4	+	+	+	+	+	+	+	
Cloranfenicol (100 µg/mL)	+	+	-	-	+	-	-	
Cepa bacteriana	+	+	+	+	+	+	+	

- Não houve crescimento do micro-organismo + Crescimento do micro-organismo

A resistência bacteriana aos fármacos é considerada um problema inerente à terapia antimicrobiana, sendo necessário buscar novas fontes terapêuticas, que

sejam eficientes no tratamento de infecções causadas por esses micro-organismos. Os produtos naturais são uma alternativa extremamente viável, contudo apesar das plantas servirem de matéria prima para muitos fármacos comercializados, há poucos antimicrobianos de origem vegetal (SILVA, et al., 2007).

Na literatura há relatos de atividade antimicrobiana de extratos orgânicos e aquosos de folhas de *I. suffruticosa*. Leite e colaboradores (2006) realizaram atividade antimicrobiana do extrato aquoso, através do método de difusão em Agar, demonstrando atividade do extrato através da formação de halo de inibição de 10 mm de diâmetro sobre cepas da espécie *S. aureus*. Estudo mais recente, testando extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa* contra *M. tuberculosis*, demonstrou uma excelente atividade, com baixas concentrações, a CIM foi determinada como 125 µg/mL.

O aminoácido triptofano sofre ação de bactérias intestinais se transformando em indol, ácido pirúvico e amônia. A molécula indol é conjugada com sulfato e excretada na urina como indoxil-sulfato, essa conjugação acontece no fígado, também mediada por ação de bactérias. Sendo o Indican precursor da molécula indoxil, o mesmo não poderia apresentar ação bacteriana uma vez que se isso acontecesse à eliminação do metabolito indoxil pela urina não seria possível (DELGADO; RESÉNDEZ; ORTI, 2014).

O que sugere que a atividade antibacteriana do extrato de *I. suffruticosa* é decorrente do sinergismo dos compostos químicos ali presentes, contudo não é influenciado pelo Indican.

5.4 Atividade antifúngica do composto sintético Indican® sobre leveduras

A atividade antifúngica contra leveduras está expressa na tabela 5. As cepas testadas apresentaram sensibilidade ao Indican®. Nas concentrações até 256 µg/mL houve inibição do crescimento de cinco (71%) cepas Candida: *C. albicans* (ATCC-76645; LM-108, LM-P20) e *C. krusei* (LM-13; LM-08). A concentração 512 µg/mL inibiu o crescimento de seis (85%) cepas do gênero Candida, apenas a cepa *C. Tropicalis* não apresentou sensibilidade ao composto.

Tabela 5: Atividade Antifúngica do composto Indican® sobre cepas do gênero *Candida*.

Composto	Micro-organismos						
Indican®	<i>C. albicans</i> ATCC-7664	<i>C. albicans</i> LM-108	<i>C. albicans</i> LM- P20	<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	<i>C. tropicalis</i> LM- 6	<i>C. krusei</i> LM-13	<i>C. krusei</i> LM-08
512 µg	-	-	-	+	-	-	-
256 µg	-	-	-	+	+	-	-
Nistatina (100 UI/mL)	-	-	-	-	+	-	+
Cepa Fúngica	+	+	+	+	+	+	+

- : Sem crescimento do micro-organismo + : Crescimento do micro-organismo

As Concentrações Inibitórias e Fungicidas Mínimas (CIM - CFM) estão expressas nas tabelas 6 e 7 respectivamente. A CIM ficou definida, respectivamente, na concentração de 256µg/mL (50%) e 512 µg/mL (85%) das leveduras. E a CFM ficou determinada nas concentrações 512 e 1024 µg/mL para as cepas: *C. tropicalis* LM-6; *C. krusei* LM-13; *C. krusei* LM-08 e *C. albicans* ATCC-76645; *C. albicans* LM-108; *C. albicans* LM-P20 respectivamente.

Tabela 6- Concentração Inibitória Mínima – CIM (µg/mL) do Indican® sobre leveduras - Técnica de microdiluição.

	Micro-organismos					
Indican®	<i>C. albicans</i> ATCC-76645	<i>C. albicans</i> LM-108	<i>C. albicans</i> LM-P20	<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803	<i>C. krusei</i> LM-08	<i>C. krusei</i> LM-13
1024	-	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-	-
256	-	-	-	+	-	-
128	-	+	+	+	-	-
64	+	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
Nistatina	-	-	-	+	-	+
Cepa Fúngica	+	+	+	+	+	+

-: Sem crescimento do microrganismo +: Crescimento do micro-organismo

Tabela 7- Concentração Fungicida Mínima – CFM ($\mu\text{g/mL}$) do composto Indican[®] sobre leveduras - Técnica de microdiluição.

Indican [®]	Cepas
512 $\mu\text{g/mL}$	<i>C. tropicalis</i> LM - 6 <i>C. krusei</i> LM - 13 <i>C. krusei</i> LM - 08
1024 $\mu\text{g/mL}$	<i>C. albicans</i> ATCC -76645 <i>C. albicans</i> LM - 108 <i>C. albicans</i> LM - P20

O resultado obtido da atividade antifúngica do Indican[®] sobre espécies de leveduras através da CIM pode ser considerado de ótima atividade biológica, levando em consideração os parâmetros estabelecidos por Sartoratto e colaboradores (2004) e Houghton et al. (2007).

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do Indican[®] sobre dermatófitos dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* está expressa na tabela 8. Os resultados mostraram que na concentração 512 $\mu\text{g/mL}$ apenas a cepa *T. rubrum* (LM-600) foi resistente e em 1024 $\mu\text{g/mL}$ houve inibição do crescimento de todas as cepas testadas.

Tabela 8: Concentração Fungicida Mínima ($\mu\text{g /mL}$) do composto Indican[®] sobre dermatófitos.

Micro-organismos					
Indican [®] ($\mu\text{g/mL}$)	<i>T. rubrum</i> LM-640	<i>T. rubrum</i> LM-600	<i>T.</i> <i>mentagrophytes</i> LM-02	<i>T.</i> <i>mentagrophytes</i> LM-202	<i>M. gypseum</i> ATCC-189
1024	-	-	-	-	-
512	-	+	-	-	-
256	+	+	+	+	+
128	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
Fluconazol	-	-	-	-	-
Cepa fúngica	+	+	+	+	+

-: Sem crescimento do microrganismo +: Crescimento do micro-organismos.

Este estudo corrobora com os dados da atividade antifúngica do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* (LEITE et al. 2006). Estudo fitoquímico demonstrou a presença do composto Indican no extrato aquoso de folhas da mesma espécie, posteriormente o composto foi isolado e testado em atividades biológicas (LIMA, et al. 2012).

Estudos envolvendo Indican® são escassos na literatura, não foi possível encontrar nenhum trabalho sobre atividade antimicrobiana do composto, tornando este ensaio inédito.

5.5 Atividade antifúngica do Indican natural de folhas *I. suffruticosa*

A determinação da CIM do Indican de folhas de *I. suffruticosa* sobre dermatófitos dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* está expressa na tabela 9. Os resultados mostraram que a concentração 1024µg/mL foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas de dermatófitos testadas, resultado semelhante ao obtido do Indican®, sugerindo atividade semelhante desses compostos. Onde foi possível observar uma atividade inibitória moderada contra os dermatófitos testados.

Tabela 9- Concentração Inibitória Mínima - CIM (µg/mL) do composto Indican de *I. suffruticosa* sobre dermatófitos.

Indican natural (µg/mL)	Micro-organismos				
	<i>T. rubrum</i> LM-640	<i>T. rubrum</i> LM-600	<i>T. mentagrophytes</i> LM-02	<i>T. mentagrophytes</i> LM-202	<i>M. gypseum</i> ATCC-189
1024	-	-	-	-	-
512	+	+	+	+	+
256	+	+	+	+	+
128	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
Fluconazol	-	-	-	-	-
Cepa fúngica	+	+	+	+	+

-: não houve crescimento do micro-organismo +: crescimento do micro-organismo

Maranhão (2008) evidenciou o efeito do Indican de folhas de *I. suffruticosa* sobre linhagens celulares, demonstrando inibição do crescimento celular em

camundongos portadores de Sarcoma 180. Lima et al., (2014) sugere em seu trabalho atividade anticancerígena e hepatoprotetora desse alcaloide.

Trabalhos reportando atividade antimicrobiana do indican de *I. suffruticosa*, não foram encontrados na literatura, contudo foi possível verificar que tanto o extrato aquoso de *I. suffruticosa* (LEITE, et al 2006) como os compostos Indican® e Indican natural apresentam atividade contra espécies de dermatófitos.

5.6 Atividade antifúngica do Índigo de folhas de *I. suffruticosa*.

A determinação da CIM do Índigo de folhas de *I. suffruticosa* sobre dermatófitos dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* está expressa na tabela 10. Os resultados mostraram que a concentração 256 µg/mL não foi ativa apenas sobre a cepa *T. mentagrophytes* (LM-202), contudo a concentração 512 µg/mL foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas de dermatófitos testadas, evidenciando uma ótima atividade biológica.

Tabela 10 - CIM (µg/mL) do Índigo de *I. suffruticosa* sobre dermatófitos.

Indigo (µg/mL)	Micro-organismos				
	<i>T. rubrum</i> LM-640	<i>T. rubrum</i> LM-600	<i>T. mentagrophytes</i> LM-02	<i>T. mentagrophytes</i> LM-202	<i>M. gypseum</i> ATCC-189
1024	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-
256	-	-	-	+	-
128	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
Fluconazol	-	-	-	-	-
Cepa fúngica	+	+	+	+	+

-: não houve crescimento do micro-organismo +: crescimento dos micro-organismos.

A atividade do índigo foi semelhante ao do fármaco padrão Fluconazol® em concentrações mais baixas, o que sugere que esse composto apresenta atividade contra dermatófitos melhor que o fármaco comercial. Chiang, et al (2013) comprovou a atividade antimicrobiana do índigo naturalis, originário de *Strobilanthes formosanus* Moore, sobre cepas de *Staphylococcus* spp. e onicomicoses não-dermatófitos.

Alcalóides indólicos isolados de *Isatis costata* também demonstraram atividade antifúngica sobre dez cepas de fungos, apresentando os melhores resultados sobre os dermatófitos *Trichophyton simii* e *Trichophyton schoenleinii* em que houve uma inibição do crescimento de 80% e da levedura *Candida albicans* que apresentou inibição de 69% (FÁTIMA et al., 2007).

Estudos realizados com tecidos tingidos com índigo natural extraído de plantas demonstraram que o mesmo apresenta atividade bactericida maior do que índigo sintético (ARIIZUMI, 2004).

5.7 Atividade antifúngica da Indirubina de folhas de *I. suffruticosa*

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Indirubina de folhas de *I. suffruticosa* sobre dermatófitos dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* está expressa na tabela 11. O composto não apresentou atividade sobre as cepas de dermatófitos, testadas nas concentrações de 4 - 1024 µg/mL, sendo, portanto, inativo para esses fungos.

Tabela 11- Concentração Inibitória Mínima - CIM (µg/mL) da Indirubina de folhas de *I. suffruticosa* sobre dermatófitos.

Indirubina (µg/mL)	Micro-organismos				
	<i>T. rubrum</i> LM-640	<i>T. rubrum</i> LM-600	<i>T. mentagrophytes</i> LM-02	<i>T. mentagrophytes</i> LM-202	<i>M. gypseum</i> ATCC-189
1024	+	+	+	+	+
512	+	+	+	+	+
256	+	+	+	+	+
128	+	+	+	+	+
64	+	+	+	+	+
32	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
Fluconazol	-	-	-	-	-
Cepa fúngica	+	+	+	+	+

-: não houve crescimento do micro-organismo +: crescimento do micro-organismos.

Nossos dados diferem de Srivastav (2014), que isolou indirubina de folhas de *Wrightia tinctoria* e demonstrou atividade contra dermatófitos *Epidermophyton floccosum*, obtendo MIC de 6,25 µg/mL, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton tonsurans* (CIM 25 µg/ml); *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton simii* (CIM

50 ug/ml). Neste trabalho foi possível observar, atividade da indirubina contra espécies fúngicas não-dermatófitas (*Aspergillus niger*, *Candida albicans*, e *Cryptococcus sp.*), através de um intervalo de MIC 0,75-25 ug/ml.

Ponnusamy, et al (2010) também testaram o composto Indirubina de *Wrightia tinctoria* contra cepas fúngicas, o composto apresentou CIM de 25 g/ml contra *Trichophyton rubrum* e *T. tonsurans* e 50 g/ml para *T. mentagrophytes* e *T. simii*. Para *Epidermophyton floccos* e *Aspergillus niger* foi observado CIM de 6,25 g/ml. O antifúngico padrão Fluconazol apresentou CIM de 25 g/ml contra *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*

Os trabalhos realizados por Leite e colaboradores (2006) demonstraram de forma mais detalhada o perfil de sensibilidade e resistência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos leveduriformes e filamentoso a extratos e frações peptídicas, respectivamente, de *I. suffruticosa*.

6 - CONCLUSÃO

6.1 Efeito Toxicológico

Os compostos Indican: sintético natural de folhas de *I. suffruticosa*, nas doses testadas, apresentaram baixa ordem de toxicidade sobre *A. salina*. Sugerindo que os compostos podem ser bem tolerados no sistema biológico.

6.2 Atividade Antimicrobiana

O Composto Indican® apresentou ótima inibição do crescimento: contra *Candida*; moderada contra *Trichophyton* e *Microsporum* e não inibiu o crescimento de *Staphylococcus* e *Pseudomonas*.

Os compostos naturais Índigo e Indican de folhas de *I. suffruticosa* apresentaram ótima e moderada atividade inibitória do crescimento respectivamente, frente a *Trichophyton* e *Microsporum*.

O Indican® apresentou atividade antifúngica frente à dermatófitos um pouco melhor que o Indican natural de folhas de *I. suffruticosa*.

Os compostos Indican (sintético e natural) apresentaram atividade contra dermatófitos semelhante ao antifúngico padrão utilizado na clínica.

O estudo revela que os compostos: Indican®, Indican e Índigo de folhas de *I. suffruticosa* podem ser promissores no tratamento de dermatites.

7 – PERSPECTIVAS

Testar os compostos Indican (sintético e natural) contra cepas e micro-organismos diferentes.

Avaliar o efeito toxicológico dos compostos Índigo e Indirubina de folhas de *I. suffruticosa*.

REFERÊNCIAS

AFSHAR, P.; KHODAVAISY, S.; KALHORI, S.; GHASEMI, M.; RAZAVYOON, T. Onychomycosis in North-East of Iran. **Iranian Journal Of Microbiology**. v.6, n.2, p. 98-103, 2014.

ALMEIDA, W.M. Síntese e avaliação da atividade fotocatalítica do Ag₂O/TiO₂ na degradação de corante. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental) - CAMPINA GRANDE- Universidade Estadual Da Paraíba, 2012.

ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**. n.3, p. 10-15, 2001.

ARGENTA, S.C.; ARGENTA, L.C.; GIACOMELLI, S.R.; CEZAROTTO, V.S. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências: Revista Eletrônica de Extensão da URI**. Vol.7, n.12, p.51-60, 2011.

ARIIZUMI, C. In: Memorias del Primer Congreso Internacional de Añil y otros Colorantes Naturales; San Salvador, El Salvador CA: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) p. 66-68, 2004.

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, Abr./Jun. 2008.

BERGOLD, A.M. & GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão new antifungic drugs: a review. **Visão Acadêmica**. v.5, n.2, p.159 -172, Jul.-Dez./2004.

BESSA, N.G.F.; BORGES, J.C.M.; BESERRA, F.P.; CARVALHO, R.H.A.; Pereira, M.A.B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S.L.; RIBEIRO, L.U; QUIRINO, M.S; CHAGAS, A.F.; ALVES, A. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v.15, n.4, p.692-707, 2013.

BIAGI, G.L.; BARBARO, A.M.; GUERRA, M.C.; FORTI, G.C.; FRACCASSO, M.E. Journal of Medicinal Chemistry, v.17, n.1, p.28-33, 1974.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Práticas Integrativas e Complementares** - Plantas Medicinais e Fitoterapia na Atenção Básica. 2009.

_____. Resolução - RDC nº 10, 9 de março de 2010.

BUGLI, F.; CACACI, M.C.; MARTINI, C.; TORELLI, R.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M.; STERBINI, F.P. Human Monoclonal Antibody-Based Therapy in the Treatment of Invasive Candidiasis. **Clinical and Developmental Immunology**.v.2013, p. 1-9, 2013.

CALVO. Significado clínico da resistência bacteriana. Em: Gómez J, Gobernado M, editores. **Enfoque clínico das grandes síndromes infecciosas**. Madrid: Ergón; p. 27-38. 2006

CALVO, T.R. Uso sustentável da biodiversidade brasileira – prospecção químico-farmacológica em plantas superiores: *Alchornea glandulosa*, *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae), *Indigofera truxillensis* e *Indigofera suffruticosa* (Fabaceae). Tese (Doutorado EM Química). Instituto de Química – Araraquara - Universidade Estadual Paulista, 2007.

CAMPOS, J.K.; FILHO, E.R.M.; SANTOS, B.S.; ARAÚJO, T.F.S. ; SANTOS, A.T.B.; LIMA, V.L.M. Efeito de extrato aquoso de *I. suffruticosa* sobre o metabolismo glicídico e lipídico de modelo experimental. In: IX Jornada de Ensino, Pesquisa e extensão, 2009, Recife. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R1481-1.pdf>

CARVALHO, M.C.G.; PIRES, R.L.; FLORINDO, W.S.; CAVALCANTI, A.S.S. Evidências para o uso de Indigo naturalis no tratamento da psoríase tipo placa: uma revisão sistemática. **Natureza on line**, v. 8, n.3, p.127-131, 2010.

CASTRO, T.L.; COUTINHO, H.D.M.; GEDEON, C.C.; SANTOS, J.M.; SANTANA, W.J.; SOUZA, L.B.S. Mecanismos de resistência da candida sp wwa antifúngicos. **Infarma**, v.18, n. 9/10, p. 30-35, 2006.

CEPLEANU, F. Validation and application of three bench-top bioassays for screening of crude plant extracts and subsequent activity-guided isolation Tese. Lausanne: Faculdade de Ciências da Universidade de Lausanne; 1993.

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, p.149-160, 2002.

CHIANG, Y.R.; LI, A.; LEU, Y.L.; FANG, J.Y.; LIN, Y.K. An *In Vitro* Study of the Antimicrobial Effects of Indigo Naturalis Prepared from *Strobilanthes formosanus* Moore. **Molecules**. v.18, p.14381-14396, 2013.

CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evalution of new antimicrobials “in vitro” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. Antibiotics in Laboratory Medicine. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; Epidemiologia das infecções hematogênicas por Candida spp. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical Uberaba**, v.36, n.5, 2003.

COSTA, C.B. Dermatofitoses: gêneros, principais espécies antropofílicas, diagnóstico laboratorial e tratamento. Monografia (Especialização em microbiologia). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2008.

- DELGADILLO, R.H.; ARIAS, D.V.; SANMIGUEL, J.J.M.; DIAZ, D.; DUBE, I.Z.; NIÑO, K.A.; ROMERO, C.C. Bismuth oxide aqueous colloidal nanoparticles inhibit *Candida albicans* growth and biofilm formation. **International Journal Nanomedicine**. v.8, p. 1645–1652, 2013.
- DELGADO, G.; MICHEL, M.R.; ORTI, A.C. Purple urine bag syndrome in end-stage chronic kidney disease. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. v.36, n.4, p.542-544, 2014.
- DIMITRIOS, P.K., VAZIRI, I.; HANNA, H.A.; BOKTOUR, M.; THORNBY, J.; HACHEM, R.; BODEY, G.P.; RAAD, I.I. Risk Factors for *Candida tropicalis* Fungemia in Patients with Cancer. **Clinical Infectious Diseases**. v.33, p.1676-1681, 2001.
- ELDIN, S.; DUNFORD, A. Fitoterapia na atenção primária a saúde. São Paulo: Manole, 2001.
- ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal emergente na comunidade. **Anais Brasileiros Dermatologia**. v. 84, n.5, p.501-6, 2009.
- ERNST, M.E.; KLEPSE, M.E.; WOLFE E.J.; PFALLER, M.A. Antifungal dynamics of LY 303366, an investigational echinocandin B analog, against *Candida* ssp. **Diagnostic Microbiological Infectious Disease**, v. 26, n. 3-4, p. 125-13, 1996.
- ESPINEL-INGROFF, A. Standardized disk diffusion method for yeasts. **Clinical Microbiology Newsletter**. v. 29, n. 13, p. 97-100, 2002.
- FATIMA, I.; AHMAD, L.; ANIS, I.; MALIK, A.; AFZA, N. Isatinones A and B, New Antifungal Oxindole Alkaloids from *Isatis costata*. **Molecules**, v. 12, p. 155-162, 2007.
- FILHO, H.F.L. Observações sobre alguns gêneros de leguminosas – papilioideal. São Paulo: Ed. Primeira, n 15. Campinas: Instituto Agrônomo, 2009. 67p. (Série Pesquisa APTA. Boletim Científico).
- FLAHERTY, J.P.; STOSOR, V. Nonfermentative Gram-negative bacilli. In: MAYHALL, C.G. **Hospital Epidemiology and Infection Control**. 3° ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 575-602, 2004.
- FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8. 2006
- FRIAS, D.F.R.; KOZUSNY-ANDREANI, D.I. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais Botucatu**, v.11, n.2, p.216-220, 2009.
- GELATTI, L.C.; BONAMIGO, R.R.; BECKER, A.P.; AZEVEDO, P.A. Staphylococcus aureus resistentes à metilicina: disseminação emergente na comunidade. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 84, n.5, p.501-6, 2009.

GLAVAN, N.; KAŠTELAN, M.; BOSAK, A.; GAČANIN, L.; PEĆANIĆ, S.; JONJIĆ, N. Successful Use of Silver Impregnated Hydrofiber Dressing in the Treatment of Kerion Celsi Caused by *Microsporum gypseum*. **Acta Dermatovenerologica Croatica**. v. 21, n.4, p. 250-252, 2013.

GÓMEZ, J.; VÁZQUEZ, E.G.; GÓMEZ, J.R. Significación clínica de las resistências bacterianas: una perspectiva histórica (1982-2007). **Revista Especializada Quimioterapia** v. 21, n.2, p. 115-122, 2008.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**.v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HARADA, T.N. Correlação entre os ensaios de citotoxicidade em *Artemia salina* leach e atividade antineoplásica sobre linhagens de células tumorais para algumas classes de produtos naturais. Dissertação (Mestrado em Saúde). Campo Grande. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 2009.

HEREDIA, A.; DAVIS, C.; BAMBA, D.; LE, N.; GWARZO, M.Y.; SADOWSKA, M.; GALLO, R.C.; REDFIELD, R.R. Indirubin-3'-monoxime, a derivative of a Chinese antileukemia medicine, inhibits P-TFb function and HIV-1 replication. **AIDS**, v, 19. n 18, p. 2087 - 2095, 2005.

HOUGHTON, P.J.; HOWES, M.J.; LEE, C.C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

JÚNIOR, C.V.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

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

KAUFMAN, G.; BERDICEVSKY, I.; WOODFOLK, J. A.; HORWITZ, B. A. Markers for host – induced gene expression in *Trichopyton dermatophytosis*. **Infection and immunity**. V. 73, n. 10, p. 6584-6590, 2005.

KNOPFEL, B.; TAVITI, F.; DIFONZO E.M. *Tinea corporis* durch *Microsporum gypseum*. **Hautarzt**, v. 42, p. 652-653, 1991.

KUNIKATA, T.; TATEFUJI T.; A.G.A.H.; IWAKI, K.; IKEDA, M.; KURIMOTO, M. Indirubin inhibits inflammatory reactions in delayed-type hypersensitivity. **European Journal of Pharmacology**. v. 410, n. 1, p. 93-100, 2000.

LEITE, S.P.; VIEIRA, J.R.C.; MEDEIROS, P.L.; LEITE, R.M.P. ; LIMA, V.L.M.; XAVIER, H.S.; LIMA, E.O. Antimicrobial Activity of *Indigofera suffruticosa*. **e-CAM**; v. 3, n. 2, p. 261–26, 2006.

LEITE, S.P.; MEDEIROS, P.L.; SILVA, E.C.; SOUZA, M.B.M.; LIMA, V.L.L.M.; SAUL, D.E. Embryotoxicity in vitro with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. **Reproductive Toxicology**, v. 18, n.5, p. 701-5, 2004.

LEITE, S.P.; SILVA, L.L.S.; CATANHO, M.T.J.A.; LIMA, E.O.; LIMA, V.L.M. Anti-inflammatory activity of *Indigofera suffruticosa* extract. **Rebrasa**, v. 7, p. 47-52, 2003.

LEWIS, G.P., ELIAS T.S. Mimoseae Bronn. In: Polhill RM, Raven PH, editors. *Advances in Legume Systematics*. Kew: Royal Botanic Garden; 1981:155-68.

LIMA, I.R. Investigação da *Indigofera suffruticosa* sobre atividade antitumoral e aspectos histológicos e morfométricos do tecido hepático de camundongos portadores de sarcoma 180. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) – Departamento de Embriologia e Histologia. Recife, Universidade Federal de Pernambuco: 2012.

LIMA, I.R.; VIEIRA, J.R.; SILVA, I.B.; LEITE, R.M.; MAIA, M.B.; LEITE, S.P. Indican from Añil (*Indigofera suffruticosa* Miller) as an herbal protective agent to the liver. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**. v.36, n.1, p.41-45, 2014.

LIN, YIN-KU; SEE, LAI-CHU; HUANG, YU-HUEI; CHANG, YA-CHING; TSOU, TENG-CHENG; LEU, YANN-LII; SHEN, YU-MING. Comparison of Refined and Crude Indigo Naturalis Ointment in Treating Psoriasis: Randomized, Observer-Blind, Controlled, Inpatient Trial. **Arch Dermatol**. v. 148, n.3, p. 397-400, 2012.

LIVERMORE, D.M. Multiple Mechanisms of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our Worst Nightmare? **Clinical Infectious Diseases**. v. 34. p. 234 -240, 2002.

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

MACIEL, M,A,M.; PINTO, A.C.; JUNIOR, V.F.V. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, V. 25, N. 3, p.429-438, 2002.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538-544,1998.

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

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

MARTOS, P.G.; ARAGÓN, J.R.; AGUDO, L.G.; LINARES, M. Dermatofitosis por *Microsporum gypseum*: Descripción de ocho casos y revisión de la literatura. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 21, p.147-149, 2004.

MATSUI, K.; NISHIKAWA, A.; SUTO, H.; TSUBOI, R.; OGAWA, H. Comparative study of *Staphylococcus aureus* isolated from lesional and non-lesional skin of atopic dermatitis. **Microbiology and Immunology**. v. 44, p. 945-947, 2000.

MENEZES, E.A.; MENDES, L.G.; CUNHA, F.A. Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 42, n.3, p. 354-355, 2009.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., Mcl. AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medical Plant Research**. v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MINAMI, Y.; KANAFUJI, T.; MIURA, K. Purification and characterization of a β glucosidase from *Polygonum tinctorium*, which catalyzes preferentially the hydrolysis of indican. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. V. 60, n. 1, p.147-149, 1996.

MIRANDA, M.C. Atividade antiulcerogênica de Plantas nativas do cerrado do Estado de São Paulo – pertencentes ao gênero indigofera. Tese (Doutorado Farmacologia). Campinas: Universidade Estadual de Campinas-SP. 2006.

MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida**. **Annals of Parasitology**. v. 59, n. 2, p. 57–66, 2013.

MOURA, A.C.S; VILEGAS, W.; SANTOS, L.C. Identificação de alguns constituintes químicos de *Indigofera hirsuta* LINN. (FABACEAE) por CLAE-IES-EM (TOF) e avaliação da atividade antirradicular. **Química Nova**. v.34, n. 7, p. 1136-1140, 2011.

MOYANO, E.G.; ERCHIGA, V.C.; GONZÁLEZ, E.S.; GONZÁLEZ, J.B.; GARCÍA, S.M. *Tinea cruris (glutealis)* de importación por *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* en España. **Revista Iberoamericana de Micología**. v. 25, p. 250-253, 2008.

NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova. PA: NCCLS, 2000.

NEGRI, M.; SALCI, T.P.; MESQUITA, C.S. S.; CAPOCI, I.R.G.; SVIDZINSKI, T.I.E.; KIOSHIMA, E.S. Early State Research on Antifungal Natural Products. **Molecule**. v. 19, p. 2925-2956, 2014.

NENOFF, P.; GINTER, H.G.; TIETZ, HJ. Onychomycose – ein Update Teil 1 – Prävalenz, Epidemiologie, disponierende Faktoren und Differenzialdiagnose. **Hautarzt**. v. 63, p. 30–8, 2012.

NENOFF, P.; KRÜGER, C.; HANSELMAYER, G.G.; TIETZ, H.T. Mycology – an update. Part 1: Dermatomycoses: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. **Journal of German Society of Dermatology**. v. 2010, p.188-209, 2014.

NETTO, M.Z.; HERREIRO, F.; BANDEIRA, C.O.P. ; ITO, Y.; CIORLIN, E.; SAQUETI, E.E.; ANSILIEIRO, I.J.; GONSALVES, L.; SIQUEIRA, V.L.D. *Staphylococcus aureus*: incidência e resistência antimicrobiana em abscessos cutâneos de origem comunitária. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 3, p. 709-712, 2001.

OLIVEIRA, C.J.; ARAUJO, T.L. Plantas medicinais: usos e crenças de idosos portadores de hipertensão arterial. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. v. 09, n. 01, p. 93 - 105, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE(WHO). **Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023**. 2013

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 2, p. 301-307, Abr./Jun. 2008.

PAPPAS, P.G ; KAUFFMAN, C.A.; ANDES, D.; BENJAMIN, D.K.; JR, CALANDRA T.F.; EDWARDS J.E.; JR, FILLER S.G.; FISHER J.F.; KULLBERG B.J.; OSTROSKY, Z.L.; REBOLI, A.C.; REX J.H.; WALSH T.J.; SOBEL J.D. Clinical Practice Guidelines for the Management of Candidiasis: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**. v. 48, p. 503–35, 2009.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SARDIÑAS, I.G.; BUELA, L.I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**. v. 8. n. 5. p. 395-400, 2001.

PAUL, S.; ROWLEY, W.S.M. Multidrug resistance in fungi: regulation of transporter-encoding gene expression. **Frontiers in Physiology**. v. 5. p. 1-14. 2014.

PEIXOTO, A.B.; NOVIS, C.F.L , VILELA, G.M.; LERER, C. Kerion: a importância da sua diferenciação com infecção bacteriana do couro cabeludo. Relato de caso*. **Revista Brasileira Clínica Médica**. V. 10, n. 3, p.243-5, 2012.

PEIXOTO, J.V.; ROCHA, M.G.; NASCIMENTO, R.T.L.; MOREIRA, V.V.; KASHIWABARA, T.G.B. Candidíase - uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. v.8, n.2, p.75-82, 2014.

PERES, N.T.A.; MARANHÃO, F.C.A.; ROSSI, A.; ROSSI, N.M.M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a Antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.85, n.5, p.657-67, 2004.

PONNUSAMY, K.; PETCHIAMMAL, C.; MOHANKUMAR, R, HOPPER, W. *In vitro* antifungal activity OF indirubin isolated from a South Indian ethnomedicinal plant *Wrightia tinctoria* R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**. v.132, p.349–354, 2010.

PONTUAL, K.A.Q. Abordagem fitoquímica, aspectos clínicos, laboratoriais, e anatopatológicos da Atividade de *Indigofera suffruticosa* Mill. (Fabaceae) em caprinos (*Capra hircus* L. 1758). Tese (Doutorado em Ciência veterinária) Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2006.

PRANEENARARAT, S. The First Reported Case of Colonic Infection Caused by *Candida tropicalis* and a Review of the Literature. **Case Reports Gastroenterology**. V.8, p. 199–205, 2014.

RAAD, I.; ALRAHWAN, A.; ROLSTON, K. *Staphylococcus epidermidis*: Emerging Resistance and Need for Alternative Agents. **Clinical Infectious Diseases**.v.26, p.1182–7, 1998.

RATTI, R.P.; SOUSA, C.P. *Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**.v.30, n.2, p.9-16, 2009.

RIBEIRO, P.M.; ITO C.Y.K.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C. Isolamento de *Candida* spp. com utilização de meio de cultura cromogênico CHRO Magar *Candida*. **Brazilian Dental Science**. v.12, n.4, p.40-45, out./dez. 2009.

RODRIGUES, L.R. Inhibition of bacterial adhesion on medical devices. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v.715. p. 351-367. 2011.

SALAS, F.S. Caracterisation de la production et optimisation du processus d'extraction des colorants de la plante de aïl (*Indigofera suffruticosa* MILL). Tese (Doutorado em Ciência dos Recursos Agrícolas). National Polytechnic Institute of Toulouse. 2005.

SALVADOR, I.S.; MEDEIROS, R.M.T.; PESSOA, C.R.M.; DANTAS, A.F.M.; JÚNIOR, G.R.; CORRE, F.R. Intoxicação por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n. 11, p. 953-957, novembro 2010.

SANDOVAL, F.S.; MÉNDEZ, C.C.; CARDADOR, A.M. Preliminary study of the Indican production in tissue cultures os *Indigofera suffruticosa* MILL. **e-Gnosis**, v.8, p. 1-7, 2010.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Revista Brasileira de Patologia Médica Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SANTOS, J.I.; COELHO, M.P.P.; NAPRI, B.P. Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v.34, n.1, p.3-6, 2002.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p. 275-280, 2004.

SILVA, J.G. Souza, I.A.; Higino, J.S.; Junior, J.P.S.; Pereira, J.V.; Pereira, M.S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n.4, p.572-577, 2007.

SILVA, V. DÍAZ, M.C.J.; FEBRÉ, N.; RED DE DIAGNÓSTICO EN MICOLOGÍA MÉDICA Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Revista Chilena Infectología**. v.19 (Supl. 2), p. 149-156, 2002.

SIQUEIRA J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTRA, M.A. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**. v.21, n.5, p.557-9, 1998.

SOARES, M.C.S.T. Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em hospitais da cidade de Niterói-RJ. . Dissertação (Mestrado em patologia experimental).Niterói. Universidade Federal de Fluminense. 2005.

SOMENZI, C.C.; RIBEIRO, T.S.; MENEZES, A. Características Particulares da Micologia Clínica e o Diagnóstico Laboratorial de Micoses Superficiais. **NewsLab** - edição 77 – 2006.

SOUSA, M.A. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA): um pesadelo para a saúde pública. **Revista de Ciências da Saúde da ESSCVP**. v. 4, p. 20-30, 2012.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**. v. 18, n. 5, p. 409-413, 2007.

SPAMPINATO, C.; DARÍO, L. *Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents. **BioMed Research International**. v. 2013, p. 1-13, 2013.

SRIVASTAVA, R. A review on phytochemical, pharmacological, and pharmacognostical profile of *Wrightia tinctoria*: Adulterant of kurchi. **Pharmacognosy Review**. v.8, n.15, p. 36–44, 2014

STERITI, R. Nutritional Support for Chronic Myelogenous and other Leukemias: A Review of the Scientific Literature. **Alternative Medicine Review** . v. 7, n.5, p. 404-409, 2002.

SUZUKI K., ADACHI R., HIRAYAMA A., WATANABE H., OTANI S., Y., KASAHARA T. Indirubin, a Chinese antileukaemiadrug, promotes neutrophilic differentiation of human myelocytic leukaemia HL-60 cells. **British Journal of Haematology**. v. 130, n. 5, p. 681-690, 2005.

TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B; CENTA, M.L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enfermagem**. v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.

VIDAL, L.H.I. Atividade de extratos aquosos de plantas sobre *Trichophyton rubrum*. Tese (Doutorado em Agronomia). Londrina: Universidade Estadual de Londrina. 2008.

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

VIEIRA, J.R.C.; SOUZA, I.A.; NASCIMENTO, S.C.; LEITE, S.P. Indigofera suffruticosa: an alternative anticancer therapy. **eCAM**. v. 4, n. 3, p. 355–359, 2007.

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

VUONG, C.; GERKE, C.; SOMERVILLE, G.A.; FISCHER, E.R.; OTTO, M. Quorum-Sensing Control of Biofilm Factors in *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 188, p. 706–18, 2003.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The Dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 8, n. 2, p. 240–259, 1995.

WINGARD, J.R. Antifungal Chemoprophylaxis after Blood and Marrow Transplantation. **Immunocompromised Host**. v. 34, p. 1386 – 1390, 2002.

WINGARD, J.R.; MERZ, W.G.; RINALDI, M.G.; JOHNSON, T.R.; KARP, J.E.; SARAL, R. Increase in *Candida krusei* Infection among Patients with Bone Marrow Transplantation and Neutropenia Treated Prophylactically with Fluconazole. **N. Engl. J. Med**. v. 325, p. 1274-1277, 1991.

YU, C. H.; SHANG, Y.T.; SHU, L.C.; SHIH, Y.Y. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, is biotransformed from indoxyl- β -D-glucoside (indican) in rats. **Toxicon**. v. 52, n.3, p. 440- 444, 2008.

ZHANG, A.; Qu, Y.; ZHANG, L.; ZENG, C.; PENG, J.; JI, X.; HOU, M.; ZHAO, Y. The different effects of indirubin on effector and CD4+CD25+ regulatory T cells in mice: potential implication for the treatment of autoimmune diseases. **J. Mol. Med.**, v. 85, nº 11, p. 1263 -1270, 2007.