



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

**INVESTIGAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E
BIOLÓGICA DE FOLHAS DE**
Indigofera suffruticosa Mill
SOBRE *Aedes aegypti*

JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

UFPE
RECIFE, PE - BRASIL
2011

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

INVESTIGAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E BIOLÓGICA DE FOLHAS DE *Indigofera*
suffruticosa Mill SOBRE *Aedes aegypti*

JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

RECIFE

2011

JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA

INVESTIGAÇÃO FARMACOGNÓSTICA E BIOLÓGICA DE FOLHAS DE *Indigofera*
suffruticosa Mill SOBRE *Aedes aegypti*

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

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

RECIFE

2011

Vieira, Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

Investigação farmacognóstica e biológica de folhas de *Indigofera suffruticosa* Mill sobre *Aedes aegypti* / Jeymesson Raphael Cardoso Vieira. – Recife : O Autor, 2011.

68 folhas ; il., fig.; tab. graf. 31 cm.

Orientador: Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Ciências Farmacêuticas, 2011.

Inclui bibliografia

1. *Indigofera suffruticosa*. 2. Extrato aquoso. 3. Indican. 4. Índigo. 5. Indirubina. 6. Atividade embriotóxica. 7. Atividade deterrente. I. Título.

UFPE

615.329

CDD (20.ed.)

CCS2011-14



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

Recife, 08 de fevereiro de 2011.

Defesa de Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 08 de fevereiro de 2011 e cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof^ª. Dr^ª. Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho.

(Dept^o de Biofísica e Radiologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE).

Assinatura: Maria Teresa Jansem de Almeida Catanho

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof^ª. Dr^ª. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes.

(Dept^o de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Assinatura: Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof^ª. Dr^ª. Roberta Maria Pereira Leite.

(Faculdade Maurício de Nassau)

Assinatura: Roberta Maria Pereira Leite

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof^ª. Dr^ª. Isabel Maria de Araújo Pinto.

(Fundação Odontológica Presidente Castelo Branco)

Assinatura: Isabel Maria de Araújo Pinto

TERCEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof^ª. Dr^ª. Jailma Santos Monteiro.

(Dept^o de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Assinatura: Jailma Santos Monteiro

A Deus, que move minha vida em uma sequência de graças

Aos meus pais, que me geram a cada dia

Aos meus familiares e amigos, que me prendem à realidade

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, gostaria de agradecer a Deus, pelo amor incondicional e pelas bênçãos que me concede a todo o momento.

Aos meus pais, que me ensinam a enxergar aquilo que não consigo ver, a ouvir aquilo que não consigo escutar e a entender o sentido real do amor.

Aos meus avós, Iracy e Odilon, por me ensinarem que o caminho a seguir é o da humildade e da fé.

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

A Professora Dra. Sônia Pereira Leite, pela doação, pela caridade e por me ensinar que o mais importante de tudo é amar.

À Professora Dra. Teresa Jansem, por me aceitar de braços abertos e acreditar que esta realidade poderia se tornar possível.

Ao Professor Dr. Haroudo Xavier e a Professora Dra. Daniela Navarro pelo suporte acadêmico, carinho e dedicação oferecidos durante todo este trabalho.

Aos meus amigos: André Catunda, Eduardo Eustáquio, Eline Viegas e Clóvis Neto que em diferentes momentos estão sempre presentes em minha vida. Estes são os irmãos que escolhi.

Aos meus amigos do laboratório de Cultura de Células: Izabela Rangel, Ivanise Brito e Antônio Fernando pela amizade, companheirismo e auxílio para a realização deste trabalho.

Aos membros dos Departamentos de Química Fundamental, de Histologia e Embriologia e de Farmácia da UFPE, onde esta realidade pôde ser desenvolvida e finalizada.

Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade"

Santo Agostinho

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Metabólitos, sistema de eluição e reveladores utilizados para o estudo cromatográfico de extratos de <i>I. suffruticosa</i> .	20
Tabela 2 - <i>Screening</i> fitoquímico de extratos de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	27
Tabela 3 - Rendimento de composto químico isolados: Indican, índigo e indirubina de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	30
Tabela 4 - Atribuição dos sinais no espectro de RMN de ^1H do alcalóide indirubina em DMSO-d6	33
Tabela 5 - Efeito do extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> em diferentes concentrações sobre o desenvolvimento de ovos de <i>Aedes aegypti</i> .	47
Tabela 6 - Efeito inibitório de extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> em diferentes concentrações sob a ecdise de larvas de <i>A. aegypti</i>	48
Tabela 7 - Efeito de extrato metanólico de folhas de <i>I. suffruticosa</i> em diferentes concentrações sob a ecdise de larvas de <i>A. aegypti</i>	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Figura 1. Arbusto de <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill	8
Figura 2 - Biossíntese dos pigmentos indigóides (alcalóides bis-indólicos) em plantas (Maugard <i>et al.</i> , 2001).	12
Figura 3 - <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill	18
Figura 4 - Representação esquemática da obtenção de derivados indigóides de folhas de <i>Indigofera suffruticosa</i>	23
Figura 5 - Derivados indigóides obtidos a partir de extrato metanólico de folhas de <i>I. suffruticosa</i> armazenadas em diferentes temperaturas. Linha 1 folhas em 5 ⁰ C e linha 2 folhas à temperatura ambiente	28
Figura 6 - Degradação térmica a 100°C do extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> durante 10min (A), 20min (B) e 30min (C).	29

Figura 7 -	Diferentes concentrações crômicas do indican reveladas pela CCD durante o processo de hidrólise do extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> .	29
Figura 8 -	Cromatograma de alcalóides índigo e indirubina de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	31
Figura 9 -	Espectro de RMN de ^1H do alcalóide indirubina (DMSO-d ₆ , 400 MHz) – Expansão de δ 11,5 até 6,3 ppm.	32
Figura 10 -	Fórmula estrutural da indirubina	33
Figura 12 -	Estrutura do índigo	35
Figura 13 -	Leitura da absorbância e transmitância no UV-Vis do alcalóide indirubina ($\lambda=535\text{nm}$) e índigo ($\lambda=671\text{nm}$).	36
Figura 14 -	Leitura da absorbância e transmitância no UV-Vis do alcalóide índigo e indirubina segundo Jan Wouters Noemi Rosario-Chirinos (1992).	36

Figura 15 -	Leitura da absorbância e transmitância no UV-Vis do alcalóide índigo (antes/índigo 1 e após 24h/índigo 2).	37
Figura 16 -	Leitura da absorbância e transmitância no UV-Vis do alcalóide índigo (antes/índigo 1 e após 24h/índigo 2).	38
Figura 17 -	Ovos de <i>Aedes aegypti</i>	43
Figura 18 -	Larva de <i>Aedes aegypti</i> no estágio L1.	44
Figura 19 -	Substrato de oviposição contendo ovos de <i>Aedes aegypti</i> . A- Controle (água destilado) B- Trato (extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i>)	45
Figura 20 -	Fotomicrografia (200x) da região anterior do intestino de larvas de <i>A. aegypti</i> após 72 h de incubação. A. Larva controle (L2) em água destilada. B. Larva tratada (L2) em extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> . LI, Lúmen Intestinal; E, Epitélio; ED, Epitélio Descontínuo; S, Segmentos.	51

Figura 21 - Principais alvos de compostos bioativos de *I. suffruticosa* que levam a dois tipos de morte celular. Raios indicam as formas de morte celular. AM: Alvo Molecular.

52

Figura 22 - O efeito deterrente do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* frente aos mosquitos de *A. aegypti*. Os dados estão expressos como mediana dos resultados em 3.634 ovos (mín-máx). * $p < 0,001$. O grupo tratado com o extrato aquoso está comparado com o grupo controle em água destilada.

54

RESUMO

Indigofera suffruticosa Mill (Fabaceae), popularmente conhecida como anil, ocorre em abundância no nordeste brasileiro e tem intenso uso popular no tratamento de infecções, inflamações e outros processos, sem relatos de efeitos colaterais nocivos ao ser humano. Para explorar o potencial desta planta e dar um embasamento científico a sua utilização, desenvolveu-se este trabalho experimental realizando estudos farmacognóstico e biológico de folhas de *I. suffruticosa* sobre ovos, larvas e mosquitos de *Aedes aegypti*. O material da pesquisa foi obtido a partir de um *screening* fitoquímico de folhas onde foram evidenciados os protocolos extrativos para identificar e isolar moléculas majoritárias presentes na espécie. Os derivados indigóides índigo e indirubina foram caracterizados pelo índice de retenção (RF), Ressonância Magnética Nuclear de prótons (RMN-¹H) e espectroscopia na região do Ultravioleta/Visível (UV-Vis). No teste embriotóxico com ovos tratados com extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* nas concentrações de 250, 500, 750, 1000µg/mL a ecdise foi observada durante 7 dias (24/24h). O desenvolvimento embrionário de larvas de *A. aegypti* no primeiro estágio (L1) foi observado de 0 à 72h utilizando concentrações de 250 a 1000µg/mL do extrato aquoso e metanólico de folhas de *I. suffruticosa*. O estudo morfológico foi realizado ao microscópio óptico (200x) e foi analisada a região anterior do intestino médio de larvas de *A. aegypti* tratadas com extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* (250µg/mL). O extrato aquoso (4,2%) mostrou a presença de derivados cinâmicos, iridóides, leucoantocianidina e indigóides. No metanólico (3,9%) foi detectada a presença de iridóides, β-sitosterol, β-amilina, leucoantocianidina, flavonóides, açúcares redutores, derivados cinâmicos e indigóides. A Cinética de Hidrólise do extrato aquoso revelou uma menor banda do indican em 10min, em 20min maior concentração e em 30min ausência de indican. Do extrato metanólico foram obtidas duas frações: metanólica (MeOH) e diclorometano (CH₂Cl₂). Da MeOH foi isolado o composto químico indican. Da CH₂Cl₂ foram isolados os compostos índigo e indirubina. Estes compostos foram caracterizados confirmando a fórmula molecular C₁₆H₁₀N₂O₂. Na atividade embriotóxica com ovos tratados com extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* nenhuma eclosão foi observada, porém o grupo controle apresentou um percentual de eclosão de 35%. Aproximadamente 93,3% das larvas (L1) tratadas com extrato aquoso (250µg/ml) apresentaram desenvolvimento até o segundo estágio (L2), por outro lado, nas outras concentrações (500, 750 e 1000µg/mL) o efeito inibitório foi mais baixo com percentuais de 20%, 53,3%, 46,6% respectivamente. No grupo controle 93,3% das larvas passaram para o estágio L4. Com o extrato metanólico a atividade embriotóxica sobre larvas não foi significativa. A observação morfológica do intestino anterior das larvas tratadas com extrato aquoso (250µg/ml) mostrou alterações na estrutura do envelope peritrófico, apresentando uma descontinuidade do epitélio subjacente, aumento do lúmen intestinal e segmentos com aspectos hipertróficos em comparação com as larvas controle. O extrato aquoso apresentou atividade deterrente sobre fêmeas de mosquitos *A. aegypti*, reduzindo significativamente a postura de ovos. Esta pesquisa demonstrou que a espécie *I. suffruticosa* é eficaz no controle do vetor da dengue e na sequência dos estudos, poderá ser utilizada nas áreas médica e farmacêutica.

Palavra-Chaves: *Indigofera suffruticosa*. Extrato aquoso. Indican. Índigo. Indirubina. Atividade embriotóxica. Atividade deterrente. *Aedes aegypti*.

ABSTRACT

Indigofera suffruticosa Mill (Fabaceae), popularly known as anil, occurs in abundance in northeastern Brazil and has intensive popular use in the treatment of infections, inflammation and other processes, with no reports of harmful side effects to humans. To explore this plant and give a scientific basis to use, this experimental work was developed to perform biological and pharmacognostical experimental studies of pharmacognosy of *I. suffruticosa* on eggs, larvae and mosquitoes of *Aedes aegypti*. The research material was obtained from a phytochemical screening of leaves with extractive protocols to identify and isolate molecules present in the majority species. The indigoids indigo and indirubin were characterized by the retention index (RF), Proton Nuclear Magnetic Resonance ($^1\text{H-NMR}$) and spectroscopy of the Ultraviolet / Visible (UV-Vis). In testing embryotoxic with eggs it was used aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* in concentrations of 250, 500, 750, and 1000 $\mu\text{g/mL}$ and the ecdysis was observed for 7 days 24/24h. The embryonic development of larvae of *A. aegypti* in the first stage (L1) was observed from 0 to 72 h using concentrations of 250 to 1000 $\mu\text{g/mL}$ of aqueous and methanolic extracts of leaves of *I. suffruticosa*. The morphological study was performed under an optical microscope (200x) and it was analyzed the anterior midgut of larvae of *A. aegypti* treated with aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* (250 $\mu\text{g/mL}$). The aqueous extract (4.2%) showed the presence of cinnamic derivatives, iridoids, leucoanthocyanidins and indigoids. In methanol (3.9%) it was detected the presence of iridoids, β -sitosterol, β -amylin, leucoanthocyanidins, flavonoids, reducing sugars, cinnamic derivatives and indigoids. Kinetics of Hydrolysis of the aqueous extract showed a smaller band of indican in 10min, 20min at higher concentration and in 30min no indican. From the methanol extracts two fractions were obtained: methanol (MeOH) and dichloromethane (CH_2Cl_2). MeOH was isolated from the chemical compound indican. From the CH_2Cl_2 the compounds indigo and indirubin were isolated. These compounds were characterized confirming the molecular formula $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$. In embryotoxic test performed with the aqueous extract of leaves of *I. suffruticosa* no hatching of eggs was observed, but the control group showed an eclosion rate of 35%. In testing embryotoxic with larvae, approximately 93.3% of larvae treated with the concentration of aqueous extract (250 $\mu\text{g/mL}$) showed development until the second stage (L2), on the other hand, other concentrations (500, 750 and 1000 $\mu\text{g/mL}$) the inhibitory effect was lower with rates of 20%, 53.3%, 46.6% respectively. In the control group 93.3% of the larvae changed to the L4 stage. The embryotoxic activity with the methanol extract on larvae was not significant. The morphological observation showed changes in the structure of the peritrophic envelope, so the larvae showed a discontinuity in the underlying epithelium, increased intestinal lumen and hypertrophied segments as compared to control larvae. L1 larvae in the presence of methanol extracts in concentrations of 250, 500, 750 and 1000 $\mu\text{g/mL}$ and distilled water (control group) had normal development until the L4 stage representing possible ways when compared with those under the effect of aqueous extract. The extract showed deterrent activity on mosquito *A. aegypti*, reducing significantly the egg-laying by females. This research demonstrated that the species *I. suffruticosa* is effective in combating dengue vector and following the studies could be used in the medical and pharmaceutical industries.

Key words: *Indigofera suffruticosa*. Aqueous extract. Indican. Indigo. Indirubin. Embryotoxic activity. Deterrent activity. *Aedes aegypti*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	05
2.1 GERAIS	05
2.2 ESPECÍFICOS	05
3 REVISÃO DA LITERATURA	06
3.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE <i>Indigofera suffruticosa</i> Mill	06
3.2 FITOQUÍMICA	08
3.3 PIGMENTOS INDIGÓIDES (ALCALÓIDES BIS-INDÓLICOS)	09
3.4 ATIVIDADE EMBRIOTÓXICA	13
3.5 DETERRENTES ORGÂNICOS	14
ESTUDO I-FARMACOGNÓSTICO	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS-ESTUDO I	18
4.1. COLETA DE MATERIAL VEGETAL	18
4.2. ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE <i>Indigofera suffruticosa</i>	19
4.2.1. <i>Screening</i> fitoquímico de <i>I. suffruticosa</i>	19
4.2.2 Investigação quantitativa dos derivados indigóides em folhas de <i>I. suffruticosa</i>	20
4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS METANÓLICO E AQUOSO DE FOLHAS DE <i>I. suffruticosa</i>	21
4.3.1 Cinética de hidrólise	21

4.4 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS INDIGÓIDES DE FOLHAS	
DE <i>I. suffruticosa</i>	22
4.5. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALÓIDES	
ÍNDIGO E INDIRUBINA DE FOLHAS DE <i>I. suffruticosa</i>	24
4.5.1 índice de Retenção (Rf)	24
4.5.2 Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN- ¹ H)	24
4.5.3 Espectroscopia na região do Ultravioleta/Visível (UV/Vis)	25
4.6 INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO DOS DERIVADOS	
INDIGÓIDES DE FOLHAS DE <i>I. suffruticosa</i>	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO-ESTUDO I	26
5.1 ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE <i>Indigofera suffruticosa</i>	26
5.1.1 Análise Cromatográfica do <i>screening</i> fitoquímico de	
extratos aquoso e metanólico de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	26
5.1.2 Investigação quantitativa dos derivados indigóides	
de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	27
5.1.3 Cinética de Hidrólise	28
5.1.4 Indican, índigo e indirubina de <i>I. suffruticosa</i>	29
5.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALÓIDES	
ÍNDIGO E INDIRUBINA DE FOLHAS DE <i>I. suffruticosa</i>	30
5.2.1 Índice de Retenção (RF)	30
5.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN- ¹ H)	31

5.2.3 Espectroscopia na região do Ultravioleta/Visível (UV-Vis)	34
5.3 INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO DOS DERIVADOS INDIGÓIDES DE FOLHAS DE <i>I. suffruticosa</i>	37
ESTUDO II-BIOLÓGICO	40
6 MATERIAIS E MÉTODOS-ESTUDO II	41
6.1 ENSAIO EMBRIOTÓXICO	41
6.1.1 Coleta e manutenção de material biológico	41
6.1.2 Criação de novas linhagens de <i>A. aegypti</i>	41
6.1.3 Teste Embriotóxico sobre ovos de <i>A. aegypti</i> tratados com extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	42
6.1.4 Teste Embriotóxico sobre larvas de <i>A. aegypti</i> tratados com extrato aquoso e metanólico de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	43
6.1.5 Estudo morfológico de larvas de <i>A. aegypti</i> tratadas com extrato aquoso de <i>I. suffruticosa</i>	44
6.2 TESTE DE OVIPOSIÇÃO SOBRE FÊMEAS DE <i>A. aegypti</i> TRATADAS COM EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE <i>I. suffruticosa</i>	44
6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO-ESTUDO II	47
7.1 TESTE EMBRIOTÓXICO	47
7.1.1 Atividade inibitória sobre a eclosão de ovos de <i>A. aegypti</i> tratados com extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	47
7.1.2 Atividade embriotóxica sobre larvas de <i>A. aegypti</i> tratadas com extratos aquoso e metanólico de folhas de <i>I. suffruticosa</i>	47

7.1.3 Observação morfológica de larvas de <i>A. aegypti</i> tratadas com extrato aquoso de <i>I. suffruticosa</i>	51
7.2 TESTE DE OVIPOSIÇÃO	53
7.2.1 Atividade deterrente de extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i> sobre fêmeas de <i>A. aegypti</i>	53
8 CONCLUSÕES	56
9 PERSPECTIVAS	57
10 REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais (HAVSTEEN et al., 1983; CALIXTO et al., 1990). Muitas destas substâncias têm grandes possibilidades de futuramente virem a ser aproveitadas como agentes medicinais.

Entre os diversos exemplos de substâncias oriundas de plantas podemos mencionar a forscolina, obtida de *Coleus barbatatus*, que apresenta promissores efeitos contra hipertensão, glaucoma, asma e certos tumores, a artemisinina, presente em *Artemisia annua*, que exerce potente atividade antimalárica, e o diterpeno anticancerígeno taxol, isolado de plantas do gênero *Taxus*, que após sua síntese em escala industrial, já se encontra disponível no mercado farmacêutico, constituindo-se numa grande esperança para pessoas portadoras de câncer nos ovários e pulmões (MONTELLANO, 1975).

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos que deve ser observado consiste nas informações da medicina popular. Dados da literatura revelam que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (BUCHI, 2002).

O vasto registro literário e folclórico acerca de plantas medicinais usadas de forma seletiva para o controle de uma diversidade de doenças revela a habilidade da

natureza em produzir uma grande variedade de substâncias químicas funcionando como autêntico “laboratório natural”. Aqui vale registrar a enorme importância que isso assume quanto ao aspecto econômico e temporal para elaboração de *screening* de plantas capazes de fornecer estruturas básicas possuidoras de atividade farmacológica ou por modificação química de seus compostos ativos (BALANDRIN et al., 1985).

As substâncias produzidas pelas plantas podem ser muito similares àquelas sintetizadas em laboratório pelo homem, porém, podem ser menos tóxicas devido às baixas concentrações encontradas nos vegetais ou pela interação direta ou indireta com outras substâncias existentes na planta. Esse conceito conferido aos chás e infusões deve ser revisto, pois se houver ingestão em excesso, ou se alguns componentes forem nocivos ao homem, os efeitos indesejados serão idênticos ou ainda piores que dos remédios sintéticos utilizados para tratar uma determinada doença (HIRONO et al., 1978; ABBOT, 1988). O fato de a população recorrer às propriedades curativas de algumas plantas despertou o interesse de muitos investigadores com o intuito de compreender e poder utilizar a natureza como recurso terapêutico, porém, com segurança e racionalidade. Além do metabolismo primário, responsável pela produção de celulose, lignina, proteínas, lipídios, açúcares e outras substâncias que realizam suas principais funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário, do qual resultam substâncias de baixo peso molecular, às vezes produzidas em pequenas quantidades. Entretanto, a despeito desta baixa produção, deve ser destacado que as plantas produzem outras substâncias, as quais atuariam como agentes defensivos na luta contra predadores, a exemplo de microorganismos patogênicos, insetos e animais herbívoros (BRANTBER e GREIN, 1994). Assim, a existência desta riqueza de metabólitos secundários poderia ser explicada pelo fato das plantas estarem enraizadas no solo, isto é, não podem se deslocar para defender-se de predadores, mas

podem lançar mão destas substâncias como uma resposta de adaptação ao meio ambiente e aos possíveis ataques dos animais e insetos. Pode acontecer também, em diversas situações de estresses bióticos e abióticos, a ativação de novas rotas biossintéticas a partir de metabólitos primários, desencadeando a produção de substâncias químicas com grande variabilidade estrutural (ABBOT, 1988).

Com o objetivo de possibilitar uma melhor compreensão do tema o Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia do Centro de Ciências Biológicas e o Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) vêm desenvolvendo experiências com plantas medicinais da flora nordestina. Como exemplo, pode-se citar trabalhos relacionados à planta *Indigofera suffruticosa* Mill.

Indigofera suffruticosa Mill é uma planta da família Fabaceae originária da Índia, comum em toda região tropical e subtropical. É uma leguminosa utilizada na adubação verde e cobertura dos solos. No Brasil, é encontrada praticamente em todo país, é uma forrageira anual ou perene adaptada à região do sertão Pernambucano. O uso na medicina popular é indicado para dores articulares e nevralgias, distúrbios circulatórios, afecção das vias respiratórias, inflamação aguda da pele e hemorragias nasais. As infusões das folhas e raízes são consideradas antiespasmódicas, diuréticas, estomáquicas, febrífugas, purgativas e sedativas. As folhas machucadas são utilizadas topicamente contra sarna, e as raízes e sementes secas são reduzidas a pó, para afugentar insetos (BRAGA, 1976; MATOS, 1999; CHANAYATH et al., 2002). Estudos farmacológicos mostraram que a planta apresenta ação toxicológica e toxicogenética (RIBEIRO et al., 1991). Pesquisas recentes têm sido realizadas para explorar o potencial desta planta e dar uma base científica a sua utilização (LEITE et al., 2003, 2004, 2006; VIEIRA et al., 2007). A diversidade de informação sobre o assunto leva a formulação

da hipótese sobre a investigação farmacognóstica da planta e ou sua eficácia terapêutica. Para comprovar estes dados, objetivou-se caracterizar e isolar compostos químicos de folhas de *I. suffruticosasa*, como também investigar as ações embriotóxica e deterrente sobre o *A. aegypti*.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAIS

2.1.1 Contribuir para o conhecimento sobre a composição química de folhas de *I. suffruticosa*.

2.1.2 Investigar atividades biológicas de folhas de *Indigofera suffruticosa* sobre ovos, larvas e mosquitos de *Aedes aegypti*.

2.2 ESPECÍFICOS

2.2.1 Identificar, isolar e caracterizar constituintes químicos de folhas de *I. suffruticosa*.

2.2.3 Estudar os efeitos da embriotoxicidade *in vitro* do extrato aquoso e metanólico de folhas de *I. suffruticosa* em ovos e larvas de *Aedes aegypti*.

2.2.4 Observar morfológicamente os efeitos do extrato aquoso de *Indigofera suffruticosa* sobre larvas de *Aedes aegypti*.

2.2.5 Avaliar a atividade deterrente do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* sob mosquitos de *Aedes aegypti*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS SOBRE *Indigofera suffruticosa* Mill

Dentre os numerosos gêneros da família Fabaceae, encontra-se aquele denominado *Indigofera*. A origem provém da palavra alemã - índigo que significa produção de pigmento azul (índigo blue) que pode ser extraído de *I. tinctoria* e de outras cinco espécies. *Indigofera* é um gênero amplamente distribuído com espécies ocorrentes na Ásia, México, Europa e América (BARROSO, 1984). O uso mais conhecido e antigo do gênero *Indigofera* é a produção do pigmento azul. No século XVI, o pigmento atingiu preço equivalente a 220 dólares/kg e era mais importante para os europeus do que o cravo da Índia. Com a colonização, as Américas passaram a ser grandes fornecedores do pigmento. A indústria usou o índigo até o início do nosso século quando a produção sintética de anilina substituiu o pigmento natural. Ainda hoje, as comunidades do interior do Brasil fabricam e usam o pigmento para colorir roupas de lã e algodão. A tecnologia de produção do pigmento consiste em fermentar as folhas para liberar o pigmento, produzindo um macerado esverdeado que é coado e alcalinizado com soda ou cinza, obtendo-se assim o pigmento azul (ALLEN et al., 1981; RODRÍGUES-KÁBANA et al., 1988).

Indigofera suffruticosa Mill (*I. suffruticosa*) da família Fabaceae (Figura 1) é bem representada na região do Agreste Pernambucano, comum em toda região tropical e subtropical (BRAGA, 1985). A Família Fabaceae é constituída por cerca de 12.000 espécies inseridas em 482 gêneros, amplamente distribuídos na natureza. As espécies são uma das maiores em dicotiledôneas (BARROSO, 1984). No Brasil, estão presentes 88 gêneros nativos ou subespontâneos e 19 cultivados. No sensu de Cronquist

(1981), pertence à subclasse Rosidae que é formada por planta considerada sob ponto de vista evolutivo como intermediário entre Magnoliidae primitivas e Asteridae avançadas. Dahlgren (1995) relacionou o padrão metabólico filogeneticamente nas diversas subclasses em angiospermas. A partir desses estudos, esse pesquisador expandiu a classificação sistemática de Cronquist/Takhtajan, sistema estes que distribuíam as famílias dicotiledônicas em seis ordens, para 25 superordens em Magnoliopsida.

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

Desde 1500 a.C. plantas e seus extratos têm sido reconhecidos como apresentando atividade anticâncer. Entretanto, o estudo sistemático de plantas como fontes de agentes antineoplásicos somente começaram com os trabalhos pioneiros de Hartwell e colaboradores, os quais, pela primeira vez, obtiveram constituintes puros originados de plantas que foram caracterizados e associados com a atividade antitumoral do extrato bruto (O'PESSOA, 1992).

Diversos usos medicinais são registrados para *I. suffruticosa* destacando-se o uso das folhas como antiespasmódico, sedativo, estomático, diurético e purgativo, antiepilético, anticonvulsivante e antiinflamatório e da raiz na icterícia. Recentemente,

efeitos embriotóxicos e atividade antimicrobiana têm sido relatados. Esta planta também é empregada nas mordeduras de cobras e como insetífuga, sendo esta última propriedade extensiva às sementes após serem pulverizadas (ROIG e MESA, 1974; ALEJO, 1996; LEITE, 2003, 2004; 2006). Possui propriedades medicinais nos tratamentos de febres, parasitoses, doenças de pele e problemas cardíacos (ALLEN et al., 1981).



Figura 1. Arbusto de *Indigofera suffruticosa* Mill (VIEIRA, 2007).

3.2 FITOQUÍMICA

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

A partir de levantamento realizado no banco dados do *Natural Products Alert* (NAPRALERT, 2003) e do *Chemical Abstracts*, foi possível traçar um perfil onde

se observa a ocorrência dos alcalóides, polifenóis, terpenóides e/ou esteróides, açúcares redutores, proteínas e indigóides.

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

Gustine (1979) verificou a presença de nitro componente encontrado na espécie em estudo.

Paiva et al., (1987) realizaram uma análise quantitativa de proteína e fibra bruta de *I. suffruticosa* sendo indicada para ser utilizada como forragem para ruminantes.

Kamal, Mangla (1993) investigando diferentes órgãos como raiz, caule, folhas e frutos de *I. suffruticosa* identificaram, caracterizaram e quantificaram 6 rotenóides ativos contra larvas de *Anopheles* e *Callosobruchus chinensis* adultos.

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

3.3 PIGMENTOS INDIGÓIDES (ALCALÓIDES BIS-INDÓLICOS)

Há mais de quatro milênios praticantes da medicina chinesa tradicional têm acumulado uma farmacopéia considerável que ainda é usada na China e em muitas outras partes do mundo. A última enciclopédia de medicina chinesa tradicional (1977) lista mais de 5.500 fontes naturais

(82,8 % de plantas) que dão base para as 100.000-500.000 prescrições da medicina tradicional chinesa. Destas, algumas são prescritas no tratamento de câncer (HOESSEL et al., 1999).

Leucemia mielóide crônica e alguns tipos de câncer têm sido tratados com a receita chinesa tradicional *Danggui Longhui Wan*, uma mistura de 11 ervas medicinais. Em 1966, o Institute of Haematology of the Chinese Academy of Medical Sciences identificou o princípio ativo desta mistura. A atividade foi detectada de um ingrediente, *Qing Dai*, um pó azul-escuro preparado das folhas de *Indigofera suffruticosa*, *Indigofera tinctoria* (Fabaceae), *Baphicacanthus cusia* (Acanthaceae), *Polygonum tinctorium* (Polygonaceae) e *Isatis indigotica* (Brassicaceae). Este pó continha um nível alto de corante azul índigo, mas a atividade antileucêmica foi atribuída ao corante vermelho indirubina, isômero do índigo, um componente secundário da mistura (HOESSEL et al., 1999).

Indigóides pertencem à classe de alcalóides bis-indólicos e são produtos naturais que têm uma longa história em razão do uso como tinturas (ENSLEY et al., 1983). Índigo foi sintetizado em 1878 e o primeiro processo industrial foi desenvolvido em 1890 (GILLAM et al., 2000). Atualmente, processos envolvendo bactérias fermentativas são utilizados para obtenção destes corantes para uso comercial. Esses alcalóides estão sendo estudados para fins medicinais

(NAM et al., 2005). Alcalóides indigóides são encontrados em plantas (MAUGARD et al., 2001), fungos (HOESSEL et al., 1999) e na urina humana (GILLAM et al., 2000). No corpo humano, o indol é produto do catabolismo do triptofano através de bactérias do intestino e é absorvido em quantidades significativas. Ele é oxidado para indoxil e excretado na urina como indoxil (3- hidroxindol) sulfato. Adicional oxidação e

dimerização do indoxil levam a formação dos pigmentos indigóides. Em plantas esses pigmentos são característicos das espécies *Indigofera* (África, Ásia, América do Sul), *Polygonum tinctorium* (China e Coréia) e *Isatis tinctoria* (Europa) (MAUGARD et al., 2001). *Indigofera* e *Polygonum* contêm indicana (indoxil- β -D-glucosídeo) que é precursora dos pigmentos indigóides, enquanto *Isatis* contém isatana B (indoxil- β -cetogluconato) como material de partida da biossíntese destes metabólitos (GARCIA-MACIAS; JOHN, 2004). Quando as folhas envelhecem os precursores são hidrolisados e o indoxil é oxidado espontaneamente gerando o índigo. Isatina é gerada paralelamente ao indoxil. A condensação de indoxil com isatina produz indirubina (Figura 2). Assim há formação de *trans*-índigo (indigotina) e *trans*-indirubina (isoindigotina), além de *cis*-índigo, isoíndigo e *cis*-indirubina (isoindirubina) (MAUGARD et al., 2001).

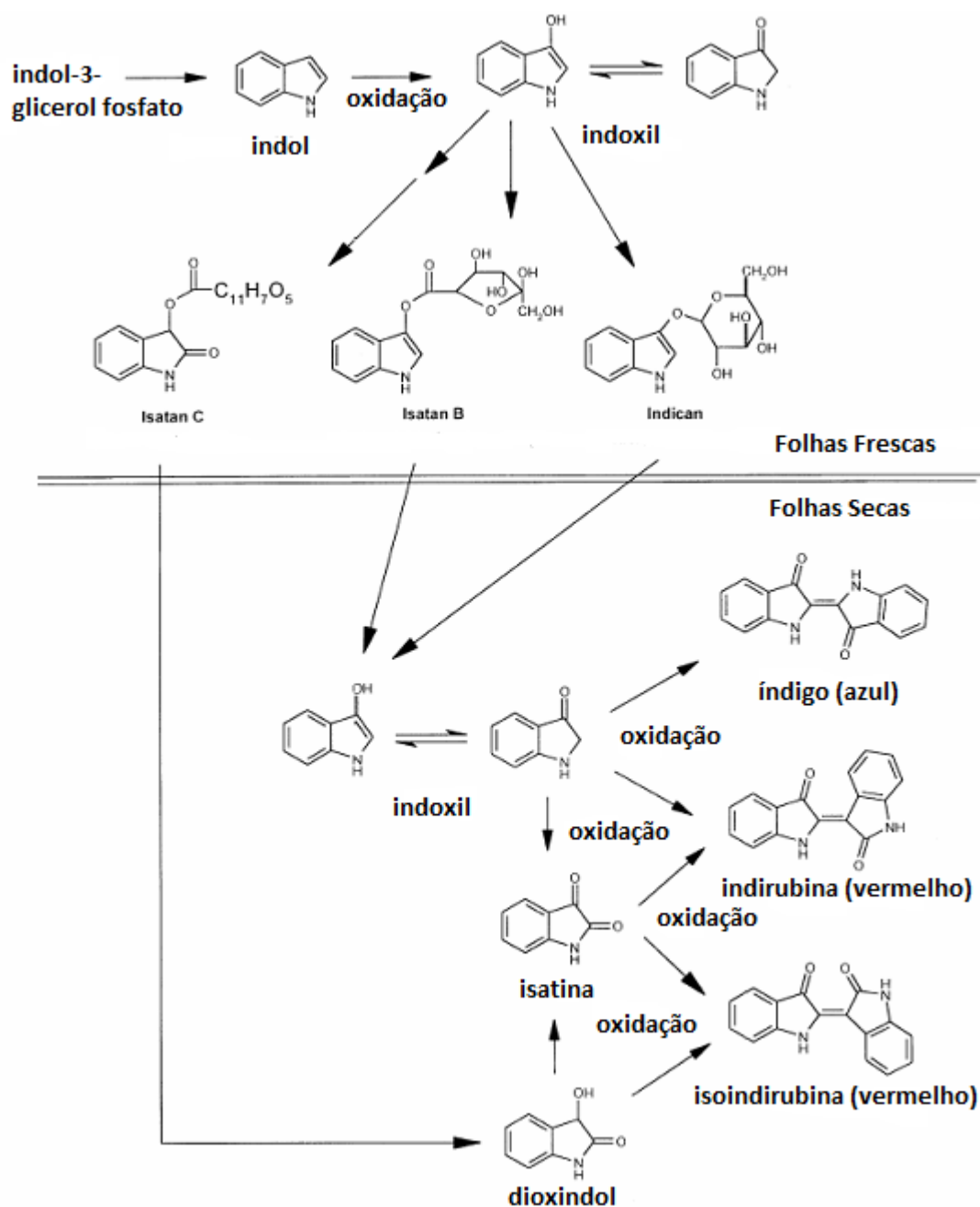


Figura 2. Biossíntese dos pigmentos indigóides (alcalóides bis-indólicos) em plantas (MAUGARD et al., 2001).

Com base nas informações sobre a composição química de *Indigofera* ocorrentes na China, Deng (1981 e 1986), isolou e caracterizou o índigo e a indirubina. O complexo índigo, um pó a base das folhas da *I. suffruticosa*, casca de *Phellodendro chinense* e bile de porco é utilizado para o tratamento da tuberculose dos nódulos de

linfoma cervical. Os resultados experimentais mostraram que o complexo índigo produz um efeito leucogênico (LIU; HE, 1991).

Estudos preliminares mostraram que a purificação do precursor do índigo foi feita por meio de coluna cromatográfica. O extrato metanólico foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel e posteriormente fracionado em coluna de Sephadex LH20, foi obtido o Isatan B, o derivado direto do Indican e o Isatan A, maior precursor do índigo (OBERTHUR, 2004).

Índigo e Indirubina são derivados da oxidação e dimerização do indoxil e isatin e liberados pelo composto precursor, indican. Tanto o índigo quanto indirubina podem ser obtidos por extração metanólica de acordo com aumento da polaridade (BALFOUR-PAUL, 1998).

3.4 ATIVIDADE EMBRIOTÓXICA

A embriotoxicidade é um ensaio experimental de cultivo de embriões. Este processo consiste na identificação das alterações nos estágios embrionários de mórula e blastocisto que estão diretamente associados com o desenvolvimento filogenético e processos patológicos (BIGGERS et al., 1971).

O mosquito transmissor da dengue, denominado *Aedes aegypti*, foi provavelmente originário da Etiópia. Esse inseto adquiriu grande capacidade de adaptação ao domicílio humano, acompanhando os povos em suas migrações pelos continentes. *Aedes aegypti* reproduz-se em reservatórios de águas limpas, estritamente no ambiente domiciliar, distanciando-se poucos metros das habitações humanas, razão pela qual geralmente não é encontrado em áreas rurais brasileiras, onde as casas aparecem isoladas (VAREJÃO et al., 2005).

Apesar dos avanços nas técnicas utilizadas para seu controle durante as últimas décadas, o mosquito *Aedes aegypti* continua causando graves problemas de saúde pública (GUSMÃO et al., 2002). A vacina contra a dengue ainda está em desenvolvimento e o controle do vetor é a única medida prática tendo em vista a redução da doença (POUPARDIN et al., 2008).

Tem sido demonstrado que o intestino do inseto é alvo de muitos compostos inseticidas. A microscopia eletrônica de transmissão de larvas de *A. aegypti* tratados com extrato aquoso de *Derris urucu* mostrou alterações histológicas no intestino, e a mortalidade larval foi associada a danos na matriz peritrófica (GUSMÃO et al., 2002). A matriz peritrófica dos insetos é constituída por proteínas, glicoproteínas, proteoglicanos e quitina (MILLER; LEHANE, 1993) e sua integridade é importante nos processos digestivos, bem como na proteção contra a invasão por microorganismos e parasitas (TELLAM et al., 1999). As plantas têm sido avaliadas como fontes de inseticidas naturais contra *A. aegypti* bioensaios com larvas têm sido realizados utilizando larvas em terceiro (L3) e quarto (L4) estádios ou comparando o efeito de extratos de plantas sobre o desenvolvimento larval de L1-L4 (MURUGAN et al., 2007). Estudos têm abordado a possibilidade de utilizar a técnica de cultura de embrião como um ensaio para o potencial embriotóxico de compostos xenobióticos (MURUGAN et al., 2007).

3.5 DETERRENTES ORGÂNICOS

Uma substância deterrente ou repelente é aquela que impede a alimentação do inseto, levando-o à morte. De acordo com Isman (2006), a deterrência é um distúrbio que está associado a mecanismos sensoriais e causa redução do consumo de alimento, provocando deficiência nutricional. A falta de nutrientes, por sua vez, pode ocasionar

atraso no desenvolvimento ou deformações. Da mesma forma, a ocorrência de deformações ou deficiência nutricional, diminui também a capacidade de movimentação do inseto, na procura por alimentos de melhor qualidade ou de locais para abrigo ou reprodução, tornando-o também mais suscetível ao ataque de inimigos naturais. Alguns fitoquímicos apresentam atividade deterrente, tal como a rotenona, descrita por Simões, 1998.

Várias são as estratégias capazes de determinar a atividade de produtos de origem natural contra insetos (MULLA; TIANYUM, 1999). De uma maneira geral, a pesquisa inicia-se com extratos brutos de plantas preparados com diversos solventes, tais como hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água. Em seguida, os extratos ativos são fracionados através de métodos cromatográficos e as frações obtidas são testadas novamente, repetindo-se o processo até a obtenção do(s) composto(s) ativo(s) (SHAALAN et al., 2005).

Se a concentração letal excepcionalmente baixa é detectada, o extrato pode ser fracionado para extrair o componente químico responsável pelo efeito. Frações isoladas do mesmo extrato podem ter diferentes atividades larvicidas, pois contêm diferentes fitoquímicos. No entanto, alguns compostos, quando testados de forma isolada, apresentam baixa eficácia, sugerindo efeito sinérgico entre as substâncias presentes no extrato, indicando que a associação destas substâncias é a responsável pela mortalidade obtida nos testes realizados (SHAALAN et al., 2005).

Os reguladores de crescimento de insetos formam um grupo de inseticidas de nova geração que causam modificações fisiológicas e morfológicas durante o desenvolvimento do inseto. Este grupo é mais conhecido pela sigla IGR (Insect Growth

Regulator). Os IGRs surgiram na década de 1970 como novo grupo de inseticidas de ação mais específica e menor toxicidade para os mamíferos do que os outros inseticidas pois atuam seletivamente ao interromper o desenvolvimento e crescimento ao invés de promover a intoxicação direta (SILVA; MENDES, 2002). Estes produtos são mais seguros e eficientes dentre os inseticidas disponíveis. A segurança reside no fato de que os hospedeiros mamíferos não possuem hormônios juvenis ou receptores destes hormônios. Extratos botânicos possuem substâncias reguladoras do crescimento que podem atuar sobre o período de desenvolvimento, crescimento, emergência de adultos, fecundidade, fertilidade e eclosão de ovos dos insetos (SHAALAN et al. 2005).

ESTUDO I – FARMACOGNÓSTICO

4 MATERIAIS E MÉTODOS-ESTUDO I

4.1 COLETA DE MATERIAL VEGETAL

O vegetal foi coletado na fase adulta, no período de floração. O material para estudo botânico foi acondicionado em sacos plásticos e transportado até o laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE onde foi efetuada a herborização. Aqueles destinados aos protocolos fitoquímicos foram acondicionados em saco plástico, procedendo-se seu encaminhamento ao laboratório de farmacognosia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para as operações extrativas.

A espécie *Indigofera suffruticosa* (Figura 3) foi coletada na cidade de Nova Cruz no estado de Pernambuco às 8h da manhã no mês de julho de 2008. As folhas foram separadas pesadas e utilizadas para o estudo fitoquímico e atividades biológicas. A amostra encontra-se catalogada no Herbário do Centro de Ciências Biológicas da UFPE sob o número 43694.



Figura 3. *Indigofera suffruticosa* Mill

4.2 ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE *Indigofera suffruticosa*

4.2.1 *Screening* fitoquímico de *I. suffruticosa*

Cerca de 15g de folhas frescas de *Indigofera suffruticosa* foram trituradas e submetidas à infusão com metanol e água (3mL) sob agitação durante 30 minutos. Os extratos de folhas de *I. suffruticosa* obtidos por infusão foram submetidos à filtração simples em papel de filtro e posteriormente, analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), empregando-se diversos sistemas de desenvolvimento e reveladores adequados (MARKHAN, 1982; HARBONE, 1982; WAGNER et al., 1984). Foi investigada a presença de alcalóides, polifenóis (cumarinas, derivados cinâmicos, flavonóides e proantocianidinas condensadas), bis-indoles (índigo e indirubina) e açúcares redutores (Tabela 1).

Tabela 1 - Metabólitos, sistema de eluição e reveladores utilizados para o estudo cromatográfico de extratos de *I. suffruticosa*.

METABÓLITOS	SISTEMA DE ELUIÇÃO	REVELADORES	REFERÊNCIA
Alcalóides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	Dragendoff	(WAGNER, 1984)
Açúcares redutores	n-BuOH-Me ₂ CO-Tampão fosfato pH=5,0 (40:50:10v/v)	Trifeniltetrazólio	(METZ, 1961)
Cumarinas	Éter-tolueno-AcOH 10% (50:50:50v/v)	UV	(WAGNER, 1984)
Derivados cinâmicos	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	NEU	(MARKHAN, 1982)
Flavonóides	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	Difenilboriloxietilamina	(NEU, 1956) (WAGNER, 1984)
Proantocianidinas condensadas	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	Vanilina sulfúrica	(MARKHAN, 1982) (HARBONE, 1982)
Índigo e Indirubina	AcOEt-HCOOH-AcOH-H ₂ O (100:11:11:27v/v)	UV	(MARKHAN, 1982))

4.2.2 Investigação quantitativa dos derivados indigóides em folhas de *I. suffruticosa*

A determinação quantitativa de derivados indigóides foi procedida utilizando 300g de folhas divididas em duas partes iguais (150g), armazenadas à temperatura ambiente e à 5°C durante 4 dias. O material vegetal foi submetido à extração

metanólica para investigar a presença de bandas dos derivados indigóides. As bandas foram analisadas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) utilizando como fase móvel o sistema: 100 v. v. acetato de etila, 2 v.v. acetato fórmico, 2v.v. ácido acético, 2v.v. água.

4.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS METANÓLICO E AQUOSO DE FOLHAS DE *I. suffruticosa*

Com base nos resultados do screening fitoquímico, extratos metanólico e aquoso foram obtidos a partir de 3 Kg de folhas recém coletadas reduzidas a pequenos fragmentos divididos em partes iguais (1,5kg). Folhas armazenadas à 5°C foram trituradas e os procedimentos extrativos foram realizados com metanol e água. Cada infusão foi preparada com 1,5 Kg de folhas em 4 L de solvente (água e metanol) à 40°C por 10min sendo o resíduo sólido removido por filtração. (LEITE, 2003). O solvente do extrato metanólico foi removido em rotaevaporador e o aquoso liofilizado, ambos para uma concentração final de 10% e posteriormente utilizados para ensaios biológicos.

4.3.1 Cinética de hidrólise

O extrato metanólico (12mL) foi submetido à hidrólise ácida e condição térmica de degradação para isolar os compostos químicos índigo e indirubina das folhas de *I. suffruticosa*. O extrato foi hidrolisado com ácido clorídrico (HCl-86mL) a 50% e posteriormente foi realizada a degradação térmica (100°C) durante 30 minutos com três retiradas a cada 10 minutos (10, 20 e 30 minutos). Alíquotas de 4mL foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando como fase móvel o sistema: 100 v. v. acetato de etila, 2 v.v. acetato fórmico, 2v.v. ácido acético, 2v.v. água. As placas de

gel de sílica foram reveladas com vanilina clorídrica para identificação do indican, precursor dos compostos a serem isolados.

4.4 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS INDIGÓIDES DE FOLHAS DE *I. suffruticosa*

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizados solventes com grau de pureza pró-análise (PA). Nas placas de cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada Sílica-gel 7747 (60PF 254) da Merck, com espessura de 0,25 mm. As análises por CCD foram realizadas em cuba saturada, com migração ascendente. Nas separações cromatográficas em coluna (CC) a proporção de sílica utilizada para empacotar a coluna foi de aproximadamente 20 vezes a massa da amostra a ser purificada.

O extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa* rotaevaporado (4g) foi submetido à cromatografia de permeação em gel, empregando-se como fase estacionária Sephadex LH20 (178g) e procedendo a eluição com metanol. As frações coletadas em diferentes tubos (n= 36) de ensaios (20ml cada) foram coletadas por semelhança e monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCD), empregando-se placas prontas em gel de sílica (PPGS) e fase móvel o sistema de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26). As placas cromatográficas foram reveladas com vanilina clorídrica. Frente a este reagente cromatográfico, as frações de 12 a 28 mostraram-se positivas para o uma substância de cor marrom. Após a revelação desta substância por CCD, as frações (12-28) foram submetidas à cromatografia de coluna (CC) em gel de Sephadex LH20. Uma alíquota da substância indican (25mL) foi dissolvida em CH₂Cl₂ e sua fase orgânica aplicada a uma coluna de Sephadex LH20 (4x40cm) equilibrada em CH₂Cl₂. A coluna foi inicialmente eluída com CH₂Cl₂ e em seguida com diclorometano – acetato de etila (CH₂CL₂-AcOEt- 2%, CH₂CL₂-AcOEt- 5% e AcOEt – 100%). Um total de 47 frações foi coletado separadamente e reunido

para ser identificado por CCD. As frações contendo indican - MeOH-AcOEt- 10% (Fr. 12-28; 310mg), índigo - CH₂CL₂-AcOEt- 2% (Fr. 17-25; 250mg) e indirubina - CH₂CL₂-AcOEt- 5% (Fr. 32-35; 110mg) foram isoladas. Os compostos químicos índigo e indirubina obtidos do extrato metanólico de folhas da espécie *I. suffruticosa* foram caracterizados (Figura 4).

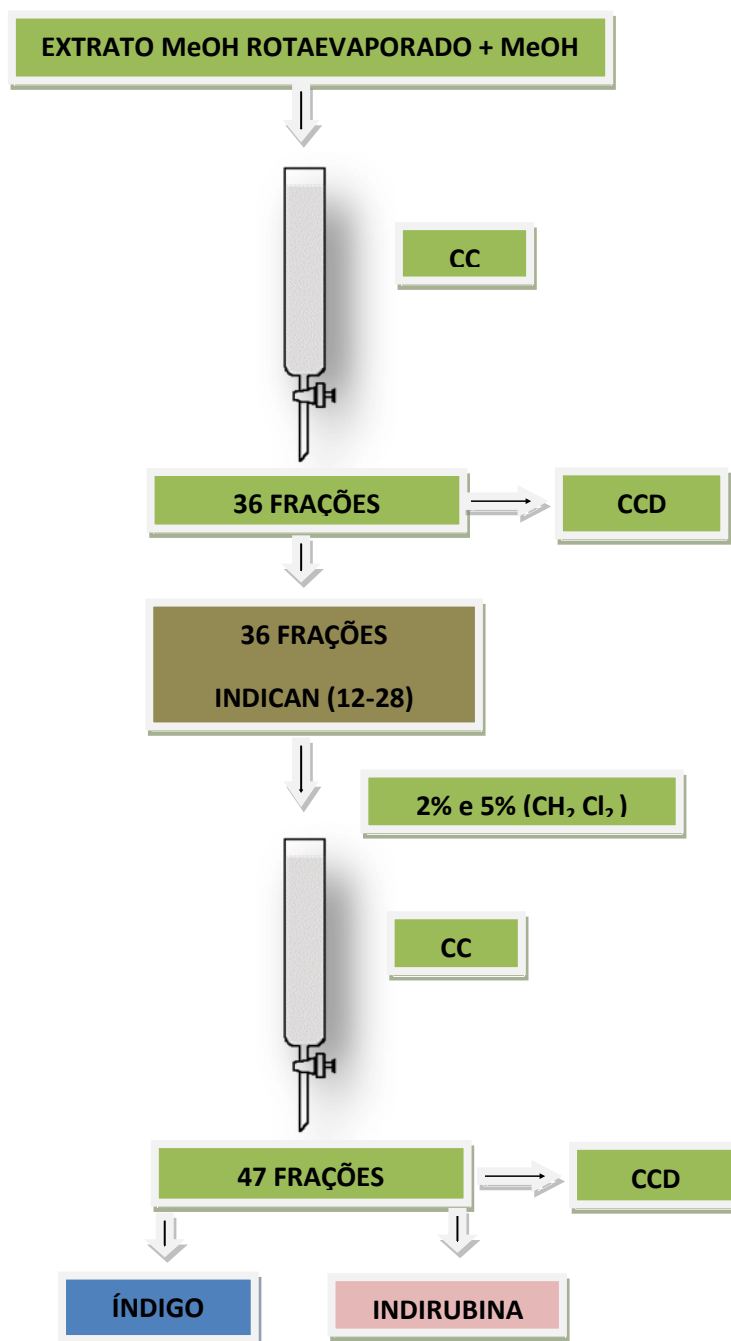


Figura 4. Representação esquemática da obtenção de derivados indigóides de folhas de *Indigofera suffruticosa*

4.5 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALÓIDES ÍNDIGO E INDIRUBINA DE FOLHAS DE *I. suffruticosa*

4.5.1 Índice de Retenção (Rf)

O Rf foi calculado através da razão entre a distância percorrida pelo composto e a distância percorrida pelo eluente (BIAGI, 1974).

$$Rf = \frac{Dc}{De}$$

Rf = Índice de Retenção

Dc = Distância percorrida pelo composto

De = Distância percorrida pelo eluente

4.5.2 Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN-¹H)

As frações de 32-35 identificadas através de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN¹H) bem como comparação com dados da literatura. O espectro de RMN RMN¹H foi obtido num espectrômetro Varian VNMRS 400, equipado com uma sonda PFG 5mm, operando com frequência igual a 400 MHz. Utilizou-se a sequência wet fornecida pela Varian para diminuir a intensidade do sinal da água. A amostra foi preparada dissolvendo o material (30mg) em 0,6 mL de DMSO-d₆ (dimetilsulfóxido deuterado), utilizando o sinal residual do solvente como referencia interna de deslocamento (d 2.5 ppm). As constantes de acoplamento (*J*) foram medidas em Hertz (Hz).

4.5.3 Espectroscopia na região do Ultravioleta/Visível (UV-Vis)

Pesou-se 2,0 mg dos compostos índigo e indirubina os quais foram dissolvidos em 100 mL de DMSO. Foi obtido um espectro no UV/Vis dessas soluções, anotando-se as absorbâncias obtidas nos comprimentos de onda entre 200-800 nanômetros (nm). Utilizou-se um Espectrofotômetro de UV/Vis Hitachi modelo U3501.

4.6 INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO DOS DERIVADOS INDIGÓIDES DE FOLHAS DE *I. suffruticosa*

As substâncias isoladas índigo e indirubina foram armazenadas em frascos de coloração âmbar por 24h, sob refrigeração (-20°C) e posteriormente analisadas por espectrofotometria de UV-vis na faixa entre 200-800 nm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO-ESTUDO I

5.1 ESTUDO FARMACOGNÓSTICO DE *Indigofera suffruticosa*

5.1.1 Análise Cromatográfica do *screening* fitoquímico de extratos aquoso e metanólico de folhas de *I. suffruticosa*

O resultado do *screening* fitoquímico obtido a partir de extratos aquoso e metanólico de folhas de *I. suffruticosa* encontra-se expresso na Tabela 2. Esses extratos foram investigados com base em técnicas de cromatografia de camada delgada (CCD) e caracterização que permitem detectar ausência e presença das classes de compostos químicos. O extrato aquoso (4,2%) apresentou maior rendimento e mostrou a presença de derivados cinâmicos, triterpenos, iridóides, leucocianidina, carboidratos e índigo, não sendo detectada a presença de flavonóides, alcalóides e cumarina. No extrato metanólico (3,9%) foi detectada a presença de: alcalóides, terpenóides (esteróides, triterpenos), índigo, polifenóis (flavonóides, cumarinas) e açúcares redutores e ausência de iridóides e saponinas.

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

Material testado	Rendimento (%)	Testes positivos	Testes negativos
Extrato aquoso	4,20%	Derivados cinâmicos, iridóides, leucoantocianidina e indigóides	Flavonóides, cumarina e açúcares redutores
Extrato metanólico	3,90%	Iridóides, β -sitosterol, β -amilina, leucoantocianidina, flavonóides, açúcares redutores, derivados cinâmicos e indigóides	Cumarina, monoterpenóides, sesquiterpenóides, ácido clorogênico, fenilpropano e glicosídeo

Constatou-se a presença predominante de derivados cinâmicos, iridóides, leucoantocianidina e indigóides, dados estes de acordo com a literatura pertinente (NAPRALERT, 2003). Entretanto, a presença do alcalóide índigo apresentou-se como uma molécula com forte fluorescência, sugerindo algo bastante singular e de certa forma a presença dessa molécula confirma esse táxon (LEITE, 2003). A partir destes dados, acredita-se que é justificado um estudo farmacognóstico tendo como marcadores alcalóides, visto que estes são abundantes em *Indigofera*.

5.1.2 Investigação quantitativa dos derivados indigóides de folhas de *I. suffruticosa*

A CCD revelou a presença dos derivados indigóides obtidos a partir de extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa* armazenadas em diferentes temperaturas. A Figura 5 expressa na linha 1 a banda do índigo e da indirubina de extrato metanólico de folhas armazenadas a temperatura de 5^oC. A linha 2 revela a ausência de bandas dos

derivados indigóides de extrato metanólico de folhas armazenadas em temperatura ambiente.



Figura 5. Derivados indigóides obtidos a partir de extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa* armazenadas em diferentes temperaturas. Linha 1 folhas em 5°C e linha 2 folhas à temperatura ambiente.

5.1.3 Cinética de Hidrólise

A Figura 6 representa três amostras do extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa* que foram submetidas à degradação térmica a 100°C durante 10min (A), 20min (B) e 30min (C) respectivamente. A CCD revelou diferentes bandas do indican (precursor do índigo e da indirubina) do extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa*. Em 10min foi revelada uma menores bandas do indican, em 20min maiores e em 30min ausência de indican (Figura 7).

Os resultados experimentais são consistentes com o mecanismo de oxidação e decomposição de reações. Esta condição sugere estudos adicionais para caracterizar indigóides derivados de folhas de *I. suffruticosa*.

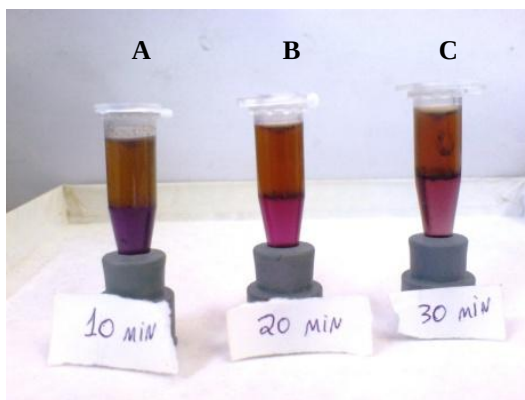


Figura 6. Degradação térmica a 100°C do extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa* durante 10min (A), 20min (B) e 30min (C).

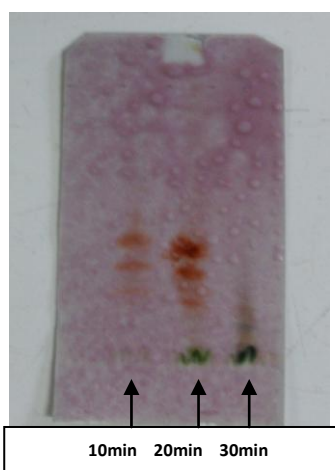


Figura 7. O cromatograma representa diferentes bandas do indican durante o processo de hidrólise do extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa* (10min/menores bandas; 20min/ maiores bandas; 30min/ ausência de bandas).

5.1.4 Indican, índigo e indirubina de *I. suffruticosa*

O rendimento dos compostos químicos isolados de folhas de *I. suffruticosa* encontram-se expressos na Tabela 3. No ensaio fitoquímico foram identificados e isolados compostos químicos obtidos do extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa*.

O extrato metanólico revelou a presença de indican por CCD. Deste extrato foram obtidas duas frações: MeOH e CH₂Cl₂. Da MeOH foi isolado o composto químico indican. Da CH₂Cl₂ foram isolados dois compostos químicos, o índigo e a indirubina. Posteriormente, os compostos químicos índigo e indirubina foram caracterizados.

Tabela 3. Rendimento de composto químico isolados: Indican, índigo e indirubina de folhas de *I. suffruticosa*

Solventes	Frações/nº	Composto	Rendimento
Metanol	(12 a 28)	Fração marrom	310 mg
Diclorometano	(17 a 25)	Fração azul	250mg
Diclorometano	(32 a 35)	Fração vermelha	110mg

5.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALÓIDES ÍNDIGO E INDIRUBINA DE FOLHAS DE *I. suffruticosa*

5.2.1 Índice de Retenção (R_f)

Os alcalóides índigo e indirubina foram caracterizados pela comparação de R_f correspondendo à fórmula molecular C₁₆H₁₀N₂O₂ descrito na literatura (MAUGARD et al., 2001). O R_f do alcalóide índigo foi 0,75 e do alcalóide indirubina 0,50 (Figura 8) semelhante à R_f's padrões descritos na literatura (CHANAYATH; LHIOCHAIPHANT; PHUTRAKUL, 2002).

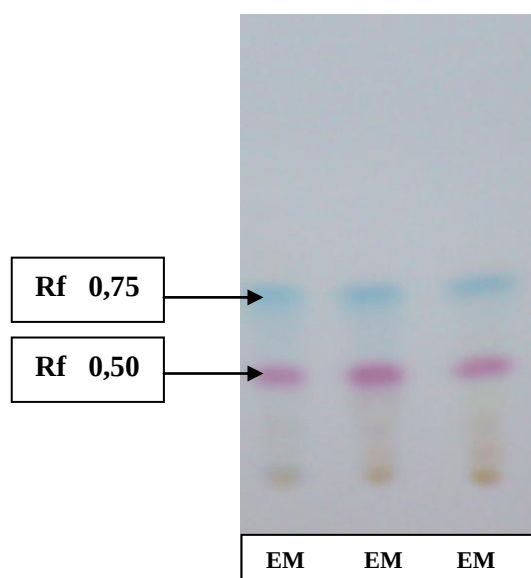


Figura 8. Cromatograma de alcalóides índigo e indirubina de Extrato Metanólico (EM) de folhas de *I. suffruticosa* armazenadas a 5⁰C.

5.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN-¹H)

O alcalóide índigo foi solúvel apenas em misturas de CHCl₂/MeOH o que inviabilizou a realização dos experimentos de RMN. A literatura relata dificuldade na solubilização de indigóides, mas apresenta dados de RMN do índigo (3,3'-dioxo-2,2'-bis-indole) em CDCl₃ (CHANAYATH; LHIOCHAIPHANT; PHUTRAKUL, 2002).

No espectro de RMN de ¹H do alcalóide indirubina (Figura 9), observa-se um conjunto de sinais na região entre δ 11,5 e 6,5 ppm que podem ser atribuídos à indirubina ((2Z)-2,3'-biindole-2',3-diona) cuja fórmula molecular está representada na Figura 10. A atribuição desses sinais está descrita na Tabela 4. A sequência de pulsos utilizada para obter o espectro de RMN de ¹H foi a WET, ou seja, com supressão do sinal de água. Considerando que a indirubina possui o grupamento N-H, a utilização dessa sequência provocou uma redução na área de integração sob os sinais atribuídos a esse grupamento (δ 10,94 e 10,85 ppm). Os resultados deste experimento são similares aos obtidos por Jun Adachi et al. (2001) quanto ao espectro de RMN de ¹H da indirubina.

Damiens et al. (2001), utilizando o composto indirubina-3'-monoxime caracterizado e isolado por Marko et al. (2001) investigou os efeitos da indirubina no ciclo celular de células HBL-100 e observou que apesar do composto não alterar a ação da maioria das células reguladoras, a indirubin-3'-monoxime paralizou a fase G2 sendo este efeito revertido quando retirado à exposição ao composto, porém reduziu a poliploidia apenas na fase M em células sincronizadas mas as mesmas evoluíram com morte celular.

Alguns análogos da indirubina como o 5-halogenoindirubina (GU, 1989), N-etil-indirubina (JI et al., 1981), N-metil-iso-índigo (JI et al., 1991) e indirubin-3'-monoxime (LI et al., 1996), exibiram alta atividade antitumoral quando comparada a indirubina em modelos animais (GU, 1989).

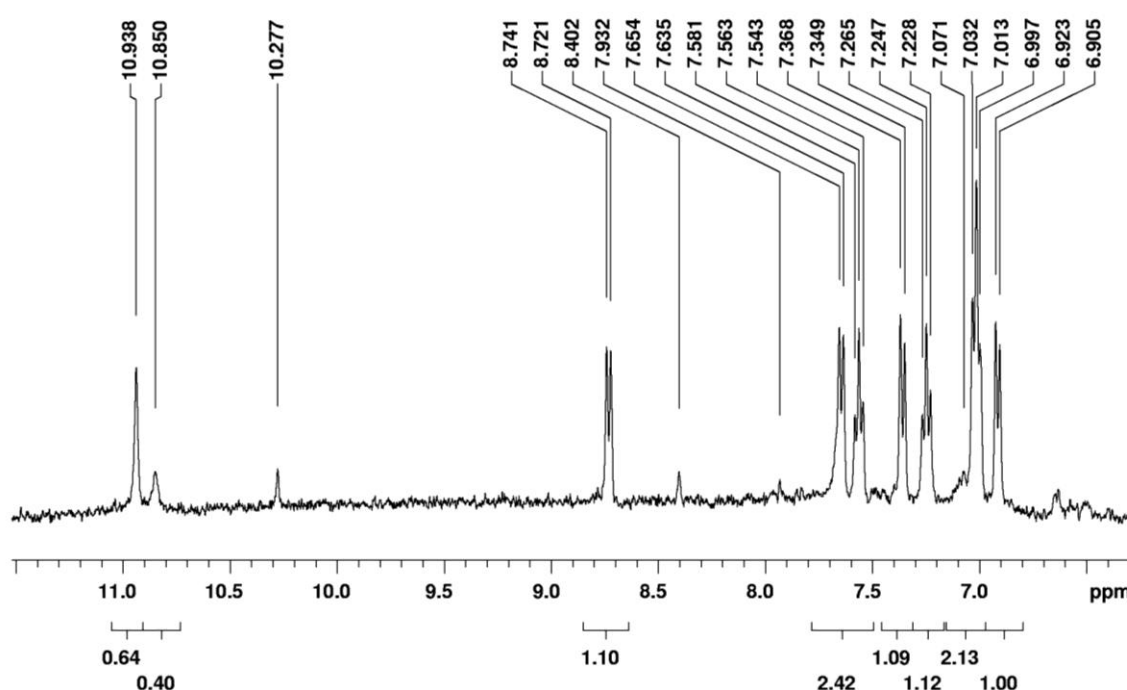


Figura 9 – Espectro de RMN de ^1H do alcalóide indirubina (DMSO- d_6 , 400 MHz) – Expansão de δ 11,5 até 6,3 ppm.

Tabela 4 – Atribuição dos sinais no espectro de RMN de ^1H do alcalóide indirubina em DMSO- d_6

Atribuição	δ (ppm)	Multiplicidade; J (Hz)
C7H	6,91	Duplete; 7,2
C5H-C5'H	7,01	Tripleto; 7,6
C6H	7,25	Tripleto; 7,2 e 7,6
C7'H	7,36	Duplete; 7,6
C6'H	7,56	Tripleto; 7,2 e 8,0
C4'H	7,64	Duplete; 7,6
C4H	8,73	Duplete; 8,0
N1'H	10,85	Simpleto
N1H	10,94	Simpleto

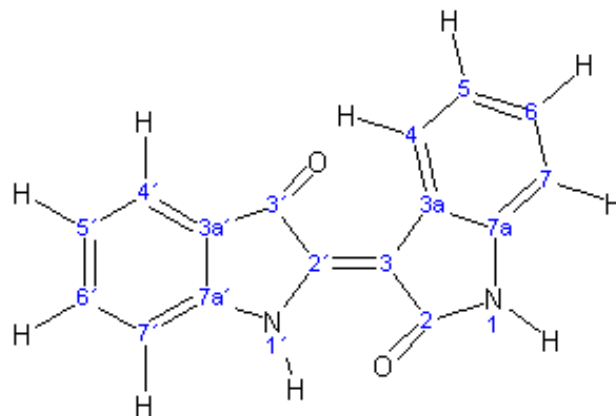


Figura 10. Fórmula estrutural da indirubina

5.2.3 Espectroscopia na região do Ultravioleta/Visível (UV-Vis)

O espectro de UV-Vis do alcalóide índigo apresentou banda de absorção característica em 600nm, assim, este composto foi caracterizado como índigo (Figura 11). Estes resultados estão de acordo com os descritos por Deng (1981, 1986) que isolou e caracterizou o índigo (Figura 12). As análises de RMN e Rf revelaram a separação cromatográfica dos compostos índigo e indirubina, porém foram observadas no Espectro de UV-Vis do alcalóide isolado indirubina, bandas características tanto para a indirubina (535nm) como para o índigo (670nm), que pode ser observadas na Figura 13.

Os resultados obtidos no presente trabalho encontram-se compatíveis com os dados sobre a indirubina registrados na literatura. Assim, um dos relatos da UV-Vis da indirubina foi resultado do estudo de Wouters; Rosario-Chirinos (1992) (Figura 14). A presença de grandes quantidades da indirubina foi encontrada em preparações de índigo comercial descritas por Popplewell Bloxam; Perkin (1910).

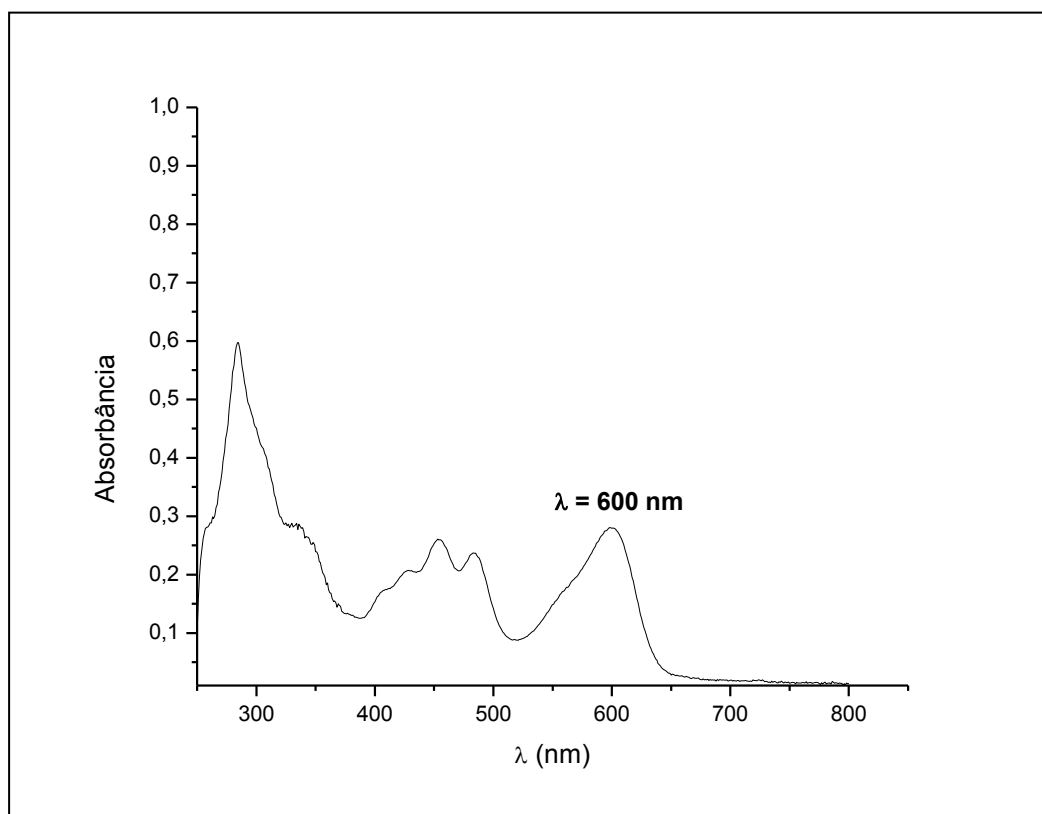


Figura 11. Leitura da absorbância e transmitância no UV-Vis do alcalóide índigo ($\lambda=600\text{nm}$).

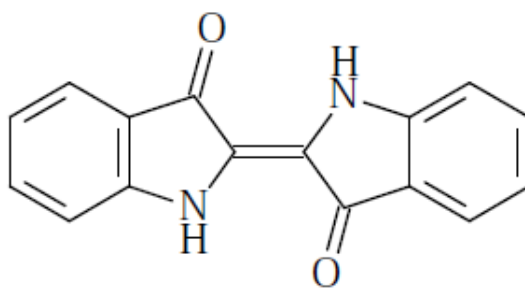


Figura 12. Estrutura do índigo

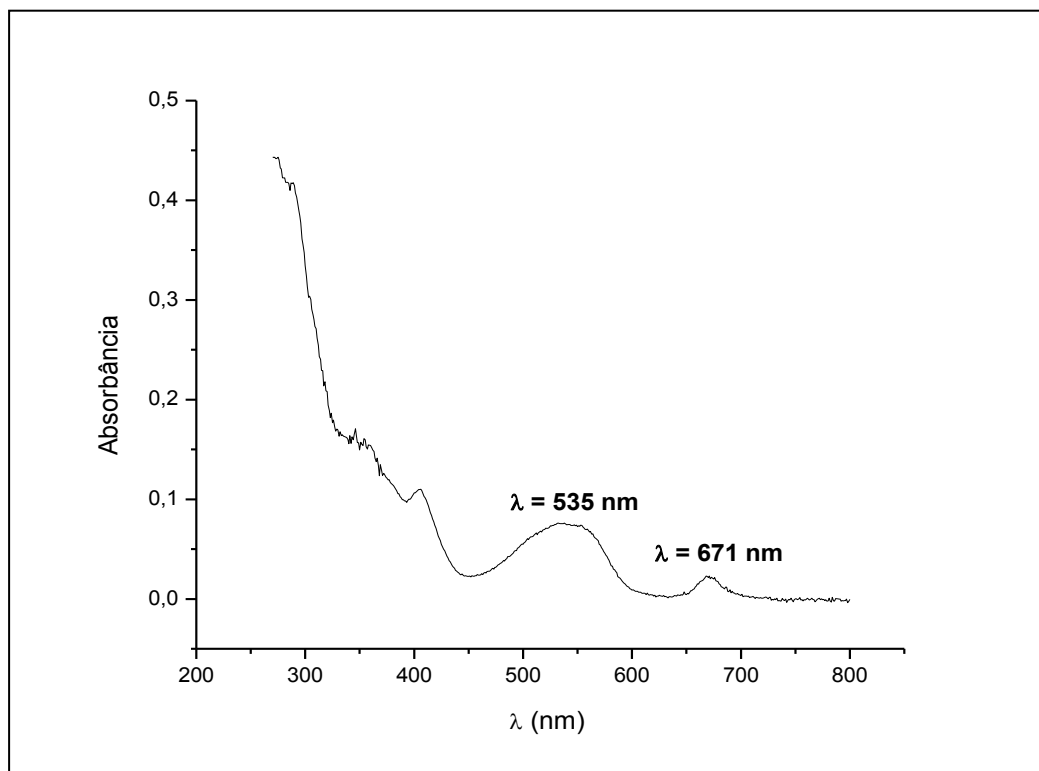


Figura 13. Leitura da absorbância e transmitância no UV-Vis do alcalóide indirubina ($\lambda=535$ nm) e índigo ($\lambda=671$ nm).

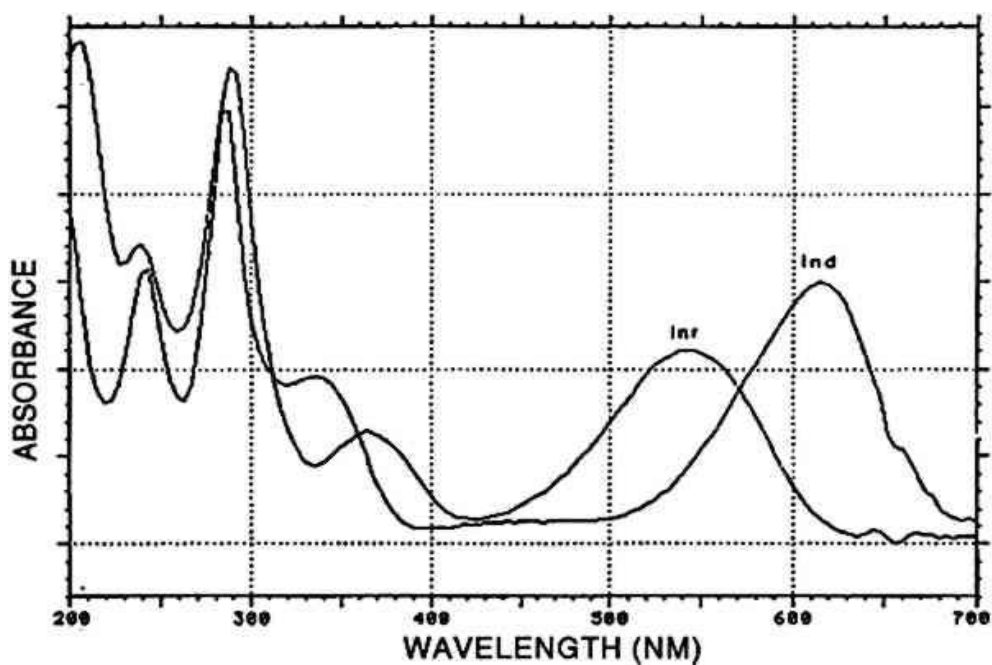


Figura 14. Leitura da absorbância e transmitância no UV-Vis do alcalóide índigo e indirubina segundo Wouters; Rosario-Chirinos (1992). Inr: indirubina, Ind: índigo.

5.3 INVESTIGAÇÃO DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO DOS DERIVADOS INDIGÓIDES DE FOLHAS DE *I. suffruticosa*

A leitura de absorbância e transmitância da UV-Vis dos alcalóides isolados, índigo e indirubina, derivados da oxidação do indican de folhas de *I. suffruticosa* antes e após serem armazenadas por 24h estão representadas nas Figuras 15 e 16. Após o armazenamento, os espectros de absorbância e transmitância dos compostos isolados se mantiveram constantes. O UV-Vis do índigo (Figura 15) revelou uma banda de 600nm. Por outro lado, o UV-Vis da indirubina (Figura 16) revelou uma banda de 535nm e de 671nm do índigo, indicando instabilidade deste alcalóide.

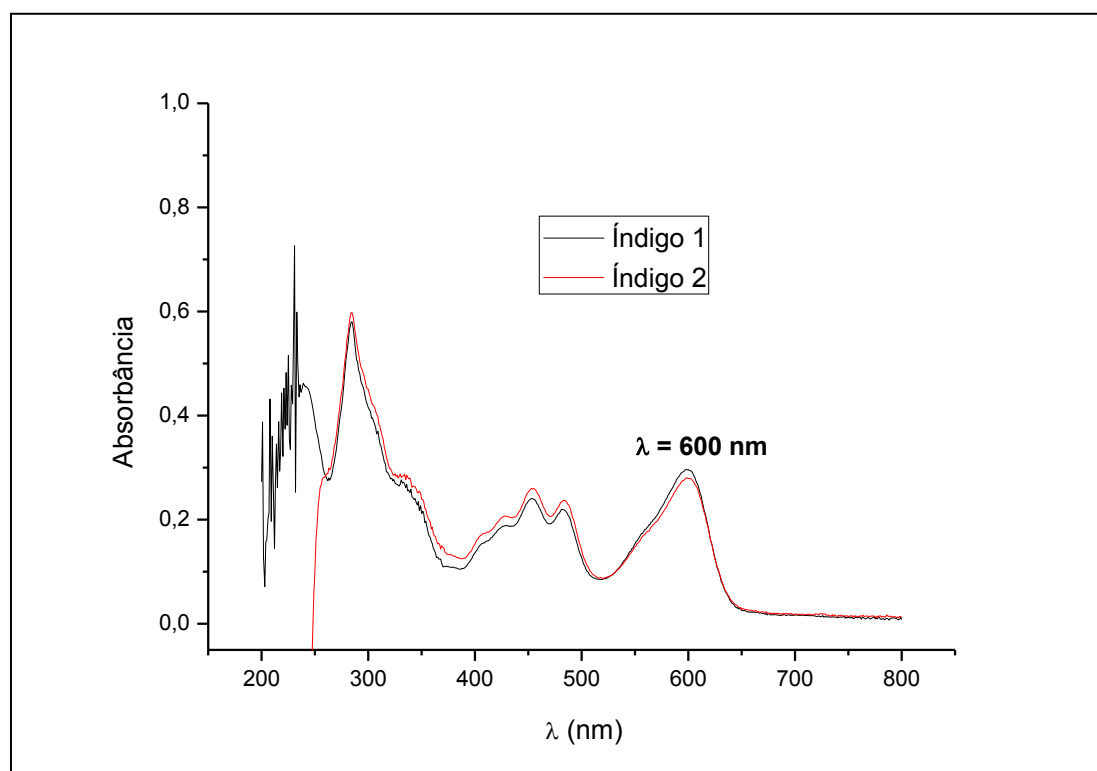


Figura 15. Leitura da absorbância e transmitância no UV-Vis do alcalóide índigo (antes/índigo 1 e após 24h/índigo 2).

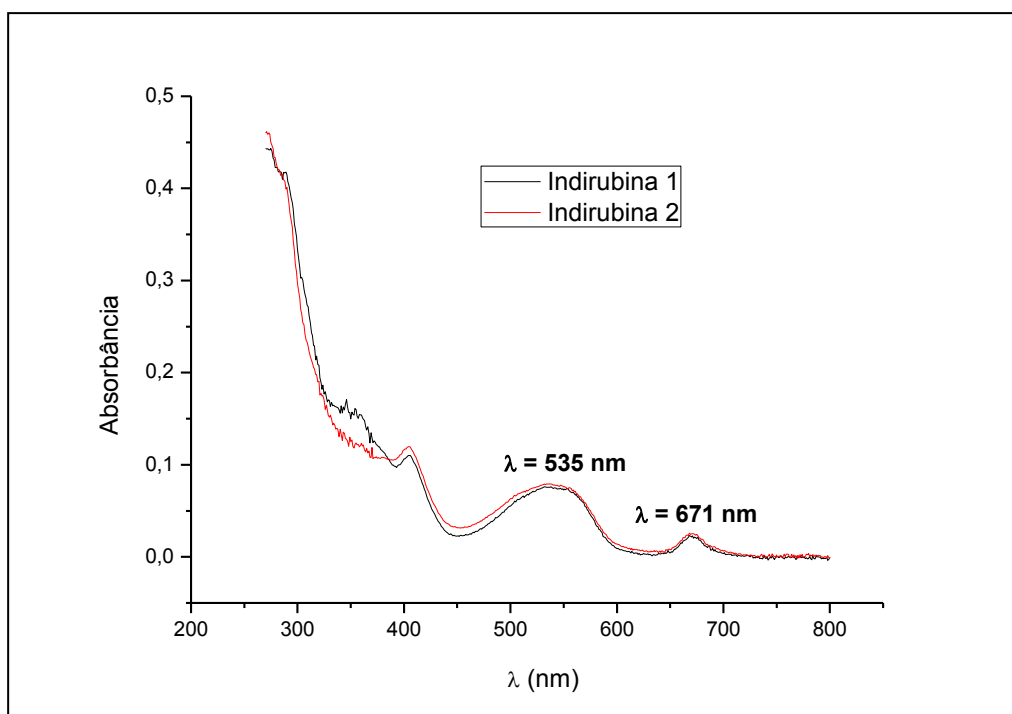


Figura 16. Leitura da absorvância e transmitância no UV-Vis do alcalóide indirubina (antes/indirubina 1 e após 24h/indirubina 2).

Em nossos experimentos, os compostos isolados índigo e indirubina foram obtidos através da oxidação do indican de folhas de *I. suffruticosa*. Neste estudo, constatou-se através das leituras da absorvância e transmitância que as concentrações crômicas do índigo e indirubina antes e após (24h) o armazenamento foram semelhantes, sugerindo uma estabilidade dos indigóides. Trabalhos reportando a investigação de oxidação e degradação de compostos químicos com o gênero *Indigofera* é escasso, e com a espécie *I. suffruticosa* não foram encontrados na literatura, o que dificulta comparar os resultados obtidos com outros nas mesmas condições. Índigo e Indirubina são derivados por oxidação e dimerização do indoxil e isatin e liberados pelo composto precursor indican ou Isatan B. A Indirubina inibe a síntese de DNA de algumas linhagens celulares. O índigo é um dos pigmentos mais antigos já conhecidos. É derivado de glicosídeo incolor da forma enol do indoxil (indican) e é formado a partir da fermentação dos vegetais: *Baphicacanthus cusia* Brem, *Indigofera suffruticosa*, *Polygonum tinctorium*, *Isatis indigotica*, seguido por oxidação pelo ar do

indoxil (MINAMI et al., 1996). Estes dados fornecem um embasamento científico para investigar métodos de armazenamento de compostos químicos de plantas que passam pelos processos de oxidação e degradação.

ESTUDO II – BIOLÓGICO

6 MATERIAIS E MÉTODOS-ESTUDO II

6.1 ENSAIO EMBRIOTÓXICO

Os testes embriotóxicos foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). O ensaio experimental consiste em cultivar as larvas e ovos de *A. aegypti*. Ovos e larvas foram analisados quanto ao fator de inibição do desenvolvimento, produzido pelos extratos aquoso e metanólico, além disso, as larvas foram analisadas morfológicamente. Os resultados foram avaliados durante o período de cultivo através de microscópio invertido (Leica) com contraste fase e os estágios de desenvolvimento foram capturados com Câmara Leica DFC-280 para o estudo morfológico.

6.1.1 Coleta e manutenção de material biológico

Larvas e ovos do *Aedes aegypti* foram obtidos do insetário do Serviço de Laboratório de Entomologia e Apoio Diagnóstico (SLEAD), Centro de Vigilância Ambiental (CVA) da prefeitura da cidade do Recife, Pernambuco-Brasil. Os mosquitos foram obtidos do laboratório de ecologia do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

6.1.2 Criação de novas linhagens de *A. aegypti*

Treze novas linhagens de *A. aegypti* foram criadas a partir de ovos coletados em criadouros dos bairros de Boa Viagem, Brasília Teimosa, Cohab, Ibura, Imbiribeira, Ipsep, Jordão e Pina do distrito Sanitário VI da cidade do Recife, utilizando armadilha de oviposição (ovitampas) para a coleta. A armadilha utilizada é formada de pote

plástico preto fosco (15cm de altura e 9 cm de diâmetro), com capacidade para o volume de 1litro. No interior de cada armadilha foram colocadas duas palhetas de madeira compensada (eucatex), de 2,5 cm x 15 cm posteriormente colocada água desclorada suficiente para cobrir cerca de um terço das palhetas.

As palhetas positivas (contendo ovos de *A. aegypti*) coletadas em campo eram colocadas em recipientes plásticos e imersas em água de infusão (feno 30%, água de torneira 70%), para eclosão dos ovos. Quando eclodiam, davam origem às larvas de primeiro estágio (L1) que eram transferidas para cubas plásticas, com água desclorada, recebendo como alimento ração para gato triturada e peneirada (Whiskas)®.

As larvas desenvolviam-se até atingirem o estágio de pupa. As pupas eram diariamente transferidas para cubas plásticas com água desclorada substituída diariamente e colocadas em gaiolas apropriadas, (laterais telados e fundos em acrílico (40 x 40 x 40 cm), até emergência dos mosquitos adultos, permanecendo os machos junto com as fêmeas para a cópula. Esta constitui a geração parental, da qual se podem adquirir novas linhagens puras.

Os mosquitos adultos foram alimentados com solução de sacarose 10%, até 24 horas antes do repasto sangüíneo. Fêmeas com três dias de idade, após a emergência, receberam repasto sangüíneo (sangue de galinha).

6.1.3 Teste Embriotóxico sobre ovos de *A. aegypti* tratados com extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*.

O extrato aquoso foi dissolvido e homogeneizado em água destilada para a realização do bioensaio. Ovos de *A. aegypti* (Figura 17) foram cultivados na presença de

diferentes concentrações do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* em fotofase de aproximadamente 12 horas a temperatura ambiente, durante sete dias. Quarenta ovos foram colocados em recipientes plásticos contendo 15 ml de água destilada e 5ml do extrato aquoso nas concentrações de: 250, 500, 750, ou 1000µg/mL. O bioensaio foi testado em duplicata (n=40). Para grupo controle foi utilizada água destilada, a mesma quantidade de ovos em igual volume do grupo tratado. A leitura da eclosão dos ovos foi realizada em intervalos de 24 horas durante 7 dias consecutivos.



Figura 17. Ovos de *Aedes aegypti*

6.1.4 Teste Embriotóxico sobre larvas de *A. aegypti* tratadas com extrato aquoso e metanólico de folhas de *I. suffruticosa*.

O extrato aquoso e metanólico de folhas de *I. suffruticosa* foi dissolvido e homogeneizado para realização do bioensaio. Os experimentos foram realizados a partir do cultivo de larvas de *A. aegypti* no estágio L1 (Figura 18) colocadas em recipientes plásticos contendo 15 ml de água destilada e 5ml dos extratos nas concentrações de: 250, 500, 750 e 1000 µg/ml por um período de 72 horas, em temperatura ambiente com fotofase aproximada de 12 horas. Cada concentração foi testada em quadruplicada (n=20). No grupo controle foi utilizada a mesma quantidade de larvas, em água

destilada em igual volume do grupo tratado. As leituras foram realizadas em intervalos de 24 horas, verificando-se o desenvolvimento das larvas.

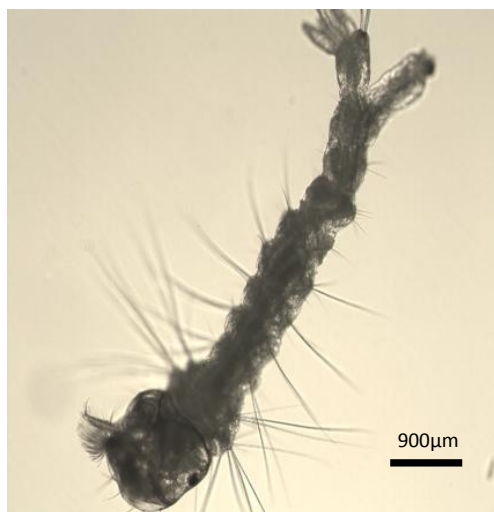


Figura 18. Larva de *Aedes aegypti* no estágio L1.

6.1.5 Estudo morfológico de larvas de *A. aegypti*. tratadas com extrato aquoso de *I. suffruticosa*

Para o estudo morfológico, larvas de *A. aegypti* tratadas com extrato aquoso de *I. suffruticosa* em concentração de 250 µg/ml e do grupo controle em água destilada foram fixadas em formaldeído a 2.5%. A observação morfológica foi realizada em microscópio óptico Leica com aumento de 200x.

6.2 TESTE DE OVIPOSIÇÃO SOBRE FÊMEAS DE *A. aegypti* TRATADAS COM EXTRATO AQUOSO DE FOLHAS DE *I. suffruticosa*

Os testes de oviposição foram realizados no Laboratório de Ecologia do Departamento de Química Fundamental da UFPE. Os mosquitos foram obtidos a partir de uma colônia mantida desde 1987 e as características desta colônia foram descritas por Marques et al., 1989. Os experimentos foram realizados com 90 fêmeas (10

fêmeas/gaiola) durante quatro dias consecutivos, em gaiolas de polipropileno (30 x 30 x 30cm) (Bugdorm-I, Mega View Science Education Services, Taiwan), providas com solução de sacarose 10% à temperatura de 25⁰ C e umidade relativa de 74% e fotofase de 12 horas. Como substrato de oviposição foi utilizado papel de filtro branco revestindo internamente 18 recipientes plásticos transparentes (7,5 x 4,5 x 5cm) contendo água. Os recipientes contendo água foram divididos em duas partes iguais, sendo nove contendo o papel de filtro embebido com 25 ml do extrato aquoso (30%) e os outros com 25ml de água destilada (Figura 19). Os bioensaios foram avaliados utilizando lupa (3x6) para quantificar a presença de ovos no substrato de oviposição e na superfície da água de cada recipiente.

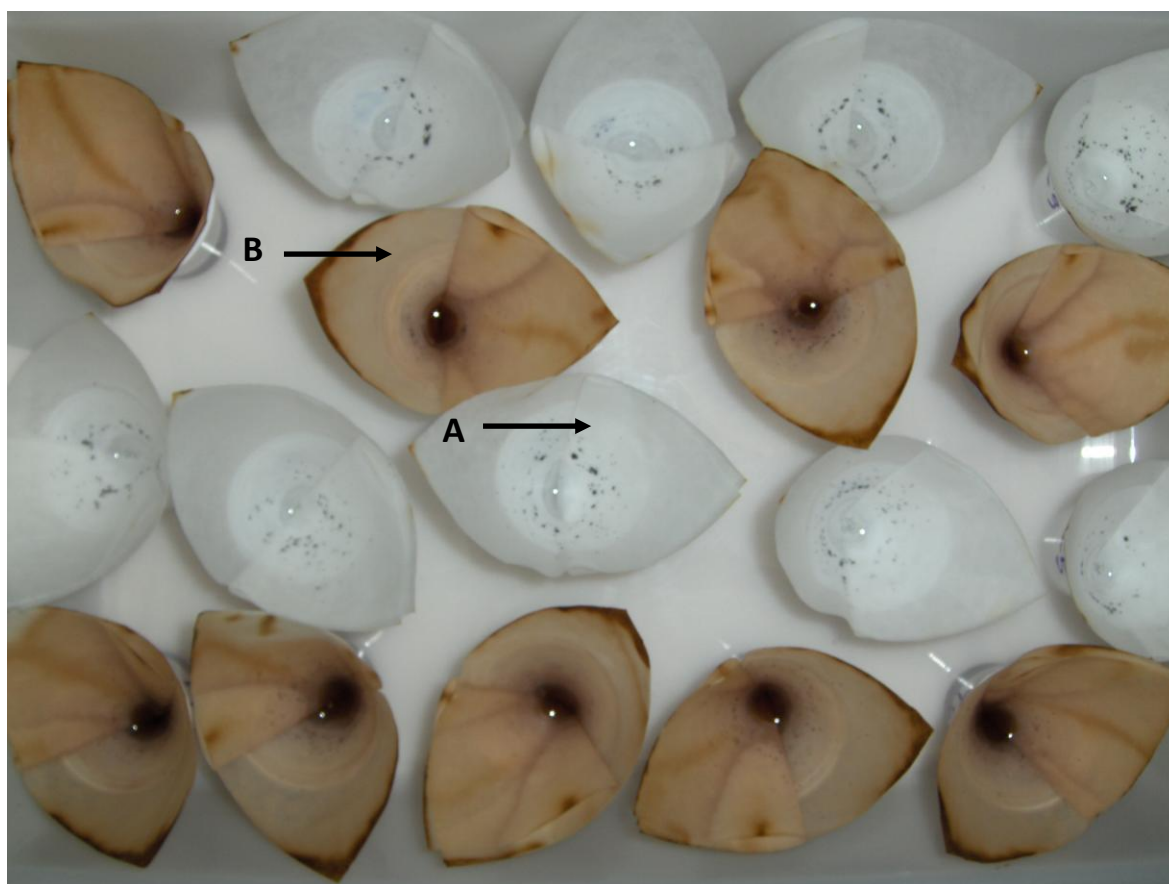


Figura 19. Substrato de oviposição contendo ovos de *Aedes aegypti*. A- Controle (água destilada)
B- Tratado (extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*).

6.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney ($p < 0,001$) utilizando-se o programa SigmaStat (versão 3.5). Os resultados do teste de oviposição foram expressos em mediana (mín-máx

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO-ESTUDO II

7.1 TESTE EMBRIOTÓXICO

7.1.1 Atividade inibitória sobre a eclosão dos ovos de *Aedes aegypti* tratados com extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*

No teste embriotóxico realizado nas diferentes concentrações (250, 500, 750, 1000µg/mL) do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* nenhuma eclosão dos ovos foi observada. O grupo controle apresentou um percentual de eclosão de 35% (Tabela 5). O extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* interfere no desenvolvimento da eclosão dos ovos de *A. aegypti*.

Table 5– Efeito do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* em diferentes concentrações sobre o desenvolvimento de ovos de *Aedes aegypti*.

Ovos ^a	Dias	Tratado ^b				Controle ^c
Eclosão (%)		Concentração (µg/mL)				
		250	500	750	1000	
	0 – 7	0.0 ^d	0.0 ^d	0.0 ^d	0.0 ^d	35

^a N° de ovos = 40; ^b extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*; ^c água destilada; ^d Nenhuma eclosão.

7.1.2 Atividade embriotóxica sobre larvas tratadas com extratos aquoso e metanólico de folhas de *I. suffruticosa*

O resultado do teste embriotóxico do extrato aquoso de *I. suffruticosa* encontra-se expresso na Tabela 6. O desenvolvimento embrionário de larvas (L1) de *A. aegypti* foi observado de 0 às 72h utilizando concentrações de 250 a 1000µg/mL do extrato

aquoso de folhas de *I. suffruticosa*. Aproximadamente 93.3% das larvas tratadas com o extrato aquoso (250µg/mL) se desenvolveram até o segundo estágio (L2), por outro lado, nas outras concentrações (500, 750, 1000µg/mL) o efeito inibitório foi mais baixo com percentuais de 20%, 53.3%, 46.6% respectivamente. No grupo controle 93,3% das larvas passaram para o estágio L4. Os resultados dos testes embriotóxicos do extrato metanólico encontram-se expresso na Tabela 7. As larvas L1 em presença do extrato metanólico nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/ml e de água destilada (grupo controle) apresentaram desenvolvimento normal até o estágio L4 durante o período de 72 horas, representando formas viáveis quando comparado com aquelas sob efeito do extrato aquoso.

Tabela 6 – Efeito inibitório de extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* em diferentes concentrações sobre larvas de *A. aegypti*

Larvas L1 ^a	Tempo de observação	Tratado ^b				Controle ^c
		Concentração				
		(µg/mL)				
		250	500	750	1000	
Inibição (%)	0h	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	24h	6.6	13.3	40.0	20.0	20.0
	48h	100.0	40.0	100.0	60.0	6.6
	72h	93.3	20.0	53.3	46.6	0.0

^a N° de larvas: 20, ^b extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*, ^c água destilada

Tabela 7 – Efeito de extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa* em diferentes concentrações sobre larvas de *A. aegypti*

Larvas L1 ^a	Tempo de observação	Tratado ^b				Controle ^c
		Concentração (µg/mL)				
		250	500	750	1000	
Inibição (%)	0h	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	24h	53.3	53.3	66.6	66.6	46.6
	48h	20	0.0	6.6	13.3	86.6
	72h	13.3	0.0	0.0	6.6	0.0

^a N° de larvas: 20, ^b extrato metanólico de folhas de *I. suffruticosa*, ^c água destilada

Os resultados mostraram embriotoxicidade específica e retardo do desenvolvimento das larvas de *A. aegypti* tratadas com extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*. Ovos de *A. aegypti* não eclodiram e larvas que desenvolveram até L2 mostraram um aumento de anormalidades, principalmente no envelope peritrófico na concentração de 250µg/mL que afetou uma das fases do ciclo de vida do *A. aegypti*. Altas incidências de embriotoxicidade específica foram encontradas em concentrações que também causaram retardo geral no desenvolvimento (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Teratogenicidade foi definida como embriotoxicidade específica que é diferente de retardo geral de crescimento e desenvolvimento de embrião. Usando esta definição, efeitos tóxicos gerais não indicam embriotoxicidade específica, desde que a toxicidade geral é induzida por algum composto se adicionado em altas concentrações (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2009). Quatro componentes não teratogênicos testados *in vivo*,

amaranto (HOLSON et al., 1975) e isoniazida (MARLOW et al., 1988) mostraram apenas retardo de crescimento e/ou efeitos letais em altas concentrações *in vitro*, contudo penicilina (BROWN et al., 1968) e sacarina (KROES et al., 1977) não mostraram nenhum efeito em altas concentrações testadas em cultura. No entanto, o fator mais importante no uso de culturas embrionárias como teste de triagem é a compreensão do pesquisador quanto ao conceito da embriotoxicidade específica, toxicidade geral e retardo no desenvolvimento. É difícil o diagnóstico de embriões malformados quando os efeitos ocorrem em baixas concentrações como descrito no presente estudo com extrato de *I. suffruticosa*.

Extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* foi estudado para testar o efeito embriotóxico em camundongos. Embriões de camundongos com duas células foram cultivados por 94h em fluido tubário humano (FTH) e o extrato na concentração de 5 mg/mL mostrou desenvolvimento de zigoto a estágio de blastocisto similar a controles e em alta concentração (10 mg/mL) todos os embriões persistiram no estágio de duas células. (LEITE et al., 2004).

Nos invertebrados, a camada de muco é primariamente secretada, revestindo e protegendo o epitélio intestinal, ao mesmo tempo apóia o processo de digestão. (CICCIA et al., 2000). No entanto, insetos não possuem uma camada mucosa típica no trato digestivo e em vez disso, o intestino é revestido por uma única estrutura protetora, o Envelope Peritrófico (EP) (PETERS et al., 1992). O EP é uma estrutura mucinosa que é unicamente diferente do muco dos vertebrados pela incorporação da quitina, resultando em uma estrutura protéica reforçada por fibras de quitina. Apesar dessas importantes funções, as propriedades bioquímicas e moleculares da formação do EP ainda não são totalmente compreendidas (WANG et al., 1994).

7.1.3 Observação morfológica de larvas de *A. aegypti* tratadas com extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*

A observação morfológica da região anterior do intestino médio de larvas de *A. aegypti* tratadas com extrato aquoso de *I. suffruticosa* (250 µg/ml) (Figura 20) mostrou alterações na estrutura do Envelope Peritrófico (PE), conseqüentemente, as larvas apresentaram uma descontinuidade do epitélio subjacente, aumento do lúmen intestinal e segmentos com aspectos hipertróficos em comparação com as larvas controle. A inibição do desenvolvimento é diretamente dependente de alterações morfológicas que ocorrem quando as larvas estão em desenvolvimento na presença de diferentes compostos bioativos do extrato.

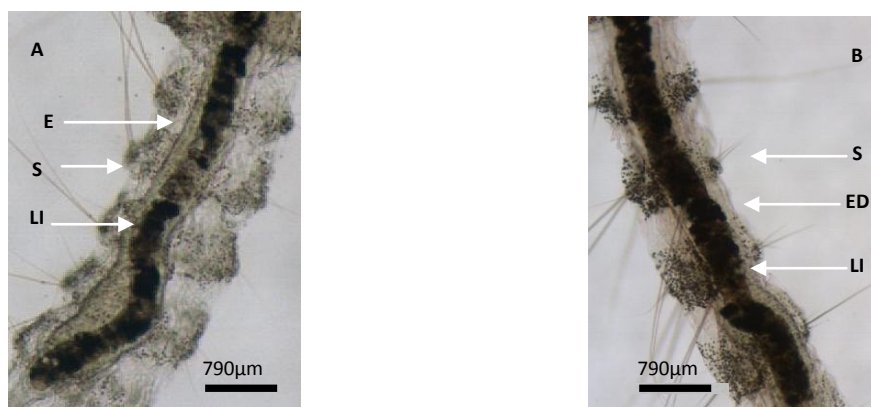


Figura 20. Fotomicrografia (200x) da região anterior do intestino médio de larvas de *A. aegypti* após 72 h de incubação. **A.** Larva controle (L2) em água destilada. **B.** Larva tratada (L2) em extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* (250µg/ml). LI, Lúmen Intestinal; E, Epitélio; ED, Epitélio Descontínuo; S, Segmentos.

Este estudo experimental demonstrou que o extrato aquoso promoveu alterações morfológicas no EP de larvas de *A. aegypti*. Além disso, a disruptura do EP afetou severamente o desenvolvimento larval. Nas larvas controles de segundo estágio de *A. aegypti* a região anterior do intestino médio estava recoberta por um EP contínuo.

É evidente que estamos longe de elucidar os mecanismos de ação da *I. suffruticosa* na indução do retardo do desenvolvimento em modelos animais. Entretanto, estudos do nosso grupo também demonstraram que esta planta é extremamente indutora de morte da célula cancerosa e possivelmente o composto indirubina da *I. suffruticosa* pode atuar se ligando a muitos alvos moleculares dentro das células ativando vias apoptóticas alternativas ou induzindo catástrofe mitótica que indica uma forma de morte celular que é causada por mitoses aberrantes pela ativação da caspase 3 e degradação oligossomal do DNA (SALVIOLI et al., 2007). Contudo, todos os dados acima mencionados indicam que *I. suffruticosa* pode induzir morte celular por diferentes vias e com diferentes mecanismos de ação, por exemplo, apoptose clássica ou catástrofe mitótica. Estas ações e os principais alvos moleculares reconhecidos de *I. suffruticosa* estão representados na Figura 21.

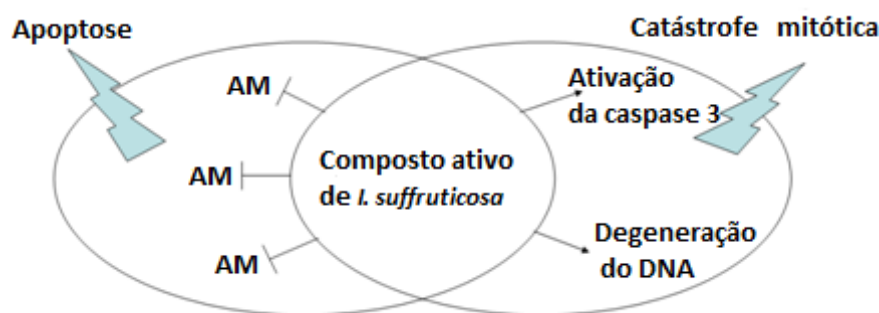


Figura 21. O esquema representa os principais alvos de compostos bioativos de *I. suffruticosa* que levam a dois tipos de morte celular. Setas indicam as formas de morte celular (apoptose e catástrofe mitótica). AM: Alvo Molecular.

Plantas e seus derivados foram usados para controlar e erradicar mosquitos e outras pestes domésticas antes do advento de químicos orgânicos sintéticos (CICCIA et al., 2000).

O uso de extratos de plantas no controle de insetos é um método de controle alternativo para minimizar os efeitos nocivos de alguns compostos pesticidas sobre a vida selvagem, do gado, espécies de insetos que não são alvo e ao meio ambiente (CHIANG et al., 1988).

Contudo, espécies de locais onde houve intenso uso de larvicida por programas de controle da dengue mostram-se mais resistentes e isto tem se tornado um grande problema de saúde pública (PINHEIRO et al., 2002).

Nesse sentido, o desenvolvimento de novos inseticidas à base de plantas descobertas através de estudos etnofarmacológicos têm mostrado resultados interessantes. O Laboratório de Cultura de Células do Departamento de Histologia e Embriologia da UFPE tem iniciado e desenvolvido avaliações da embriotoxicidade causada por compostos bioativos a partir de extratos naturais de plantas.

Purificação de compostos bioativos de *I. suffruticosa* está em andamento e futuras investigações podem aumentar o entendimento de possíveis alterações no desenvolvimento a partir de extrato aquoso desta planta utilizada na medicina popular.

7.2 TESTE DE OVIPOSIÇÃO

7.2.1 Atividade deterrente de extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* sobre fêmeas de *A. aegypti*

A atividade deterrente do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* sobre a oviposição de fêmeas de *A. aegypti* encontra-se expresso na Figura 22. No teste de oviposição com 90 fêmeas, os ovos foram quantificados (3.634 ovos) após três dias de observação utilizando uma concentração de 30% do extrato aquoso de *I. suffruticosa*. O extrato aquoso embebido no substrato (88 (13-210)) reduziu significativamente a

postura de ovos pelas fêmeas quando comparado com o controle tratado com água destilada (343 (185-406)). Como visto, o extrato aquoso apresentou atividade deterrente significativa sobre fêmeas de *A. aegypti*.

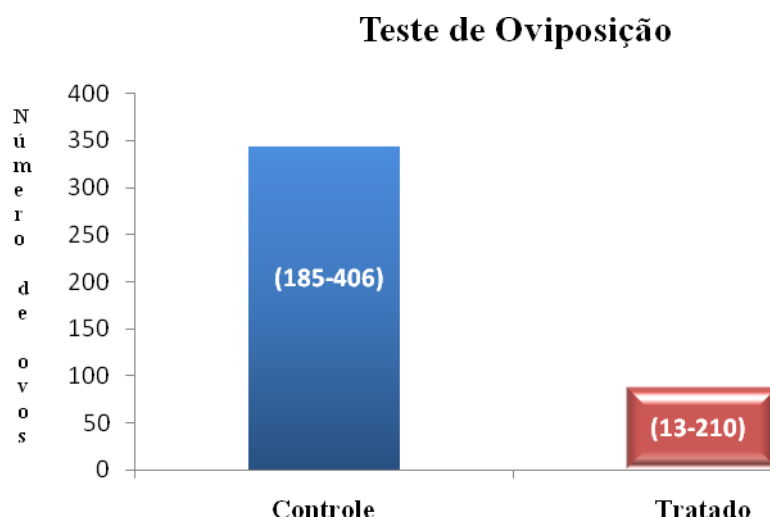


Figura. 22. Atividade deterrente do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* frente às fêmeas de *A. aegypti*. Os dados estão expressos em mediana (mín-máx) com n= 3.634 de ovos. *p<0,001. O grupo tratado com o extrato aquoso está comparado com o grupo controle em água destilada.

Trabalhos reportando a atividade deterrente ou repelente de indigóides com a espécie *I. suffruticosa* não foram encontrados na literatura, o que dificulta comparar os resultados obtidos com outros nas mesmas condições.

Dentre os testes realizados com fitoquímicos, os óleos essenciais de vegetais são os mais utilizados como atraentes ou repelentes de insetos (BOWMAN, 2006). Em muitas plantas são encontradas substâncias geralmente voláteis que podem ser detectadas pelas antenas ou tarsos de insetos. Entre essas, estão os monoterpenos (citronelal, linalol, mentol, pinenos, mentona, carvona e limoneno), os sesquiterpenos

(farnesol, nerolidol), os fenilpropanóides (safrol, eugenol) e muitos outros compostos (SIMÕES & SPTZER, 2004). Muitas espécies de plantas da Família Lamiaceae são tóxicas para insetos, como as do gênero *Ocimum* spp (PALSSON & JAENSON, 1999). Extratos de plantas incluindo *Ocimum basilicum*, *O. gratissimum*, *O. americanum*, *Cymbopogon nardus*, *Alpinia galanga*, *Syzygium aromaticum* e *Thymus vulgaris*, *Mentha*, *Eucalyptus maculata citriodon*, *Tagetes* e *Lantana camara* (ANSARI et al. 2005) têm sido estudadas como possíveis repelentes de mosquitos. Os indigóides isolados e caracterizados de folhas de *I. suffruticosa* estão sendo investigados para testar seus efeitos no controle do *A. aegypti*.

8 CONCLUSÕES

8.1 FARMACOGNÓSTICO DE FOLHAS DE *I. suffruticosa*

- Os constituintes químicos majoritários identificados em extrato aquoso de folhas de *Indigofera suffruticosa* foram: Derivados cinâmicos, iridóides, leucoantocianidina e indigóides e em extrato metanólico: Iridóides, β -sitosterol, β -amilina, leucoantocianidina, flavonóides, açúcares redutores e derivados cinâmicos, indigóides.
- Os indigóides índigo e indirubina foram isolados e caracterizados de folhas de *I. suffruticosa*.

8.2 BIOLÓGICO SOBRE *A. aegypti*

- O extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* nas concentrações de 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentou atividade embriotóxica sobre ovos de *Aedes aegypti*.
- Os extratos aquoso e metanólico de folhas de *I. suffruticosa* nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ apresentaram atividade embriotóxica sobre larvas de *A. aegypti*.
- O extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$ mostrou uma discontinuidade na membrana peritrófica de larvas de *A. aegypti*.
- O extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* (30%) apresentou atividade deterrente sobre mosquitos *A. aegypti*.

9 PERSPECTIVAS

- Investigar os análogos da indirubina de folhas de *I. suffruticosa*.
- Avaliar os efeitos do índigo, da indirubina e seus análogos em atividades biológicas.
- Implementar testes embriotóxicos utilizando compostos químicos de plantas medicinais ou sintéticos.
- Investigar indigóides de folhas de *I. suffruticosa* como Regulador de Crescimento de Celular.
- Investigar o índigo e a indirubina no controle do *A. aegypti*.

10 REFERÊNCIAS

ABBOT, P.J. Comfrey: assessing the low cost health risk. **Med. J. Aust.**, v.149, n.1, p-678-682, 1988.

ALEJO, J. P.; MIRANDA, R.; RODRIGUES, G. Actividad Anticonvulsivante; (Antiepileptica) del extracto fluido de *Indigofera suffruticosa* (Anil Cimarrón). **Rev Cubana plant Méd**, v.1, n.2, p.7-10, 1996.

ALLEN, O.N.; ALLEN, E. Leguminosae: source book of Characteristics, uses and nodulation. Washington: **The University of Wisconsin Press**, p. 813, 1981.

ANSARI, M.A. et al. Larvicidal and insect repellent activities of pine (*Pinus longifolia*, Family: Pinaceae) oil. **Journal Veterinary Borne Disease**, v.42, p.95-9, 2005.

AYLWARD, J. H. et al. *Indigofera* species with agronomic potential in the tropics. Rat toxicity studies. **Aust. J. Agric. Res.**, v.38, n.1, p.177-88, 1987.

BALANDRIN, M. F.; KLOCKE J. A.; WURTELE, E. S.; BOLLINGER, W. H. Natural plant chemicals: source of industrial and medicinal materials. **Science** 228: 1154-1160, 1985.

BALFOUR-PAUL, J. Indigo. **British Mus. Press. London**, Ed.1, 1998.

BARBOSA NETO, J.D. et al. Anemia hemolítica causada por *Indigofera suffruticosa* (Leg. Papilionoideae) em bovinos. **Pesq. Vet. Bras.**, v.21, n.1, 2001.

BARROSO, G.M. Sistemática da Angiosperma do Brasil. São Paulo: **EDUSP**, v.2, 1984.

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.

BIGGERS, J. D.; MOORE, B. D.; WHITTINGHAM, D. G. Development of mouse embryos *in vivo* after cultivation from two-cell ova to blastocysts *in vitro*. **Nature**. n.194, p.734-35, 1971.

BOWMAN, D.D. **Parasitologia Veterinária de Georgis**. 8.ed. Barueri: Manole, 422p, 2006.

BUCHI, D.F. Efeitos do medicamento homeopático método canova em camundongos normais e portadores de tumor sarcoma 180. **Informações científicas da jornada médica realizada em Curitiba**. 2002.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará**. 3ª edição. Mossoró: Escola Superior de Agricultura, p.452, 1976.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste Especialidade do Ceará**. 4ª edição. Natal: Editora Universitária da UFRN, 1985.

BRANTNER, A., GREIN, E. Antibacterial activity of plant extract used externally in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v.44, n.1, p.35-40, 1994.

BROWN, D.M., HARPER, K.H., PALMER, A.K., TESH, S.A. Effects of antibiotics upon pregnancy in the rabbit. **Toxicol Appl Pharmacol**. 12:295, 1968.

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

CICCIA, G., COUSSIO, J., MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of medicinal South American plants. **J. Ethnopharmacology**. 72: 185-9, 2000.

CHANAYATH, N.; LHIEOCHAIPHANT, S.; PHUTRAKUL, S. Pigment Extraction Techniques from the Leaves of *Indigofera tinctoria* Linn. and *Baphicacanthus cusia* Brem. And Chemical Structure Analysis of Their Major Components. **CMU Journal**, v.1, n.2, p.149, 2002.

CHIANG R G; DAVEY K G. A novel receptor capable of monitoring applied pressure in the abdomen of an insect. **Science**. 241: 1665-7, 1988.

DAHLGREN, G. On Dahlgrenograms a system of classification of the angiosperms and its use in mapping characters. **An Acad. Bras. Ci.**, v.67, n.3, p.384-404, 1995.

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

DENG, B. Column Chromatographic-spectrophotometric Determination of indigo and indirubin in Qing-Dai, A traditional Chinese medicine. **Qingdai. Chung TS' Ao Yao**, v.12, n.6, p.115, 1981.

DENG, B. Direct Colorimetric Method for Determination of indigo and indirubin in **Qingdai. Chung TS' Ao Yao**, v.17, n.4, p.163-164, 1986.

DOMINGUES, X.A. et al. Chemical component from *Jiquilite indigofera suffruticosa* Mill. **Planta Medica**, v.34, n.2, p.172-175, 1978.

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

FERRAZ, E.M.N. et al. Composição florística em trechos de vegetação da caatinga e brejo de altitude na região do vale do Pajeú. Pernambuco. **Revista Brasileira de Botânica**, v.21, n.1, p.7-15, 1998.

GARCEZ, W. S. et al. A nitropropanoyl-glucopyranoside from *Indigofera suffruticosa*. **Phytochemistry**, v.28, n.4, p.1251-1252, 1989.

GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R.; BARISON, A. Additional 3-nitropropanoyl éster of glucose from *Indigofera suffruticosa* (Leguminosae). **Biochemical Sytematics and Ecology**, v.10, n.6, p.20-22, 2002.

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

GUSMÃO, D.S., PÁSCOA, V., MATHIAS, L., CURCINO, V.I.J., BRAZ-FILHO, R., ALVES, L.F.J. *Derris* (Lonchocarpus) *urucu* (Leguminosae) extract modifies the peritrophic matrix structure of *Aedes aegypti* (Diptera:Culicidae). **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 97 (3): 371-5, 2002.

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

GU, Y. C., LI, G. L., YANG, Y. P., FU, J. P. & LI, C. Z. Synthesis of some halogenated indirubin derivatives. **Acta Pharm. Sin.** 24, 629–632, 1989.

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

HARBONE, J. B. **Phytochemical Methods**. London: Chapman & Hall, 2a ed., p.288, 1982.

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

HIRONO, I; NORI, H; HAGA, M. Carcinogenic activity of *Symphytum officinale*. **Journal of The National Cancer Institute**, V. 61, 1978. P. 865-869, 1978.

HOESSEL, R.; LECLERC, S.; ENDICOTT, J. A.; NOBEL, M. E. M.; LAWRIE, A.; TUNNAH, P.; LEOST, M.; DAMIENS, E.; MARIE, D; MARKO, D.; NIEDERBERGER, E.; TANG, W.; EISENBRAND, G.; MEIJER, L. Indirubin, the active constituent of a chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. **Nature Cell Biology**, v. 1, p.60-67, 1999.

HOLSON, J.F., GAINES, T.B., SCHUMACHER, H.J., CRAMMER, M.F.. Is red dye No. 2 teratogenic: a joint government-industry approach to a toxicological problem. **Toxicol Appl Pharmacol**. 33: 122, 1975.

ISMAN, M.B. Botanical Insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review Entomology**, v.51, p.45-66, 2006.

JI, X.J. et al. Studies on the antineoplastic effect and toxicity of synthetic indirubin. **Acta. Pharm. Sin.**, v.16, p.146-148, 1981.

JI, X. J.; LIU, X. M.; LI, K.; CHEN, R. H.; WANG, L. G. Pharmacological studies of meisoindigo: absorption and mechanism of action. **Biomed. Environm. Sci.** 4, 332–337, 1991.

KAMAL, R.; MANGLA, M. *In vivo In vitro*, Investigation on rotenoids from *Indigofera suffruticosa* and their bioefficacy against the larvae of *Anopheles stephensi* and adults of *Callosobruchus chinensis*. **J Biosc.**, v.18, n.1, p.93-110, 1993.

KROES, R., PETERS, P.W.J., BERKVEN, J.M., VERSCHUUREN, T.D., VANESCH, G.J. Long term toxicity and reproduction study (including a teratogenicity study) with cyclamate, saccharin and cyclohexylamine. **Toxicology**. 8: 285-300, 1977.

LEITE, S.P. et al. Anti-inflammatory Activity of *Indigofera suffruticosa* extract. **Revbrasa**, v.7, n.1, p.47-52, 2003.

LEITE, S.P. *Indigofera Suffruticosa* Mill: ensaio fitoquímico e ações biológicas biológicas. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2003.

LEITE, S.P. et al. Embryotoxicity *in vitro* with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. **Reproductive Toxicology**, v.18, n.5, p.701-705, 2004.

LEITE, S.P. et al. Antimicrobial Activity of *Indigofera Suffruticosa*. **eCAM**, v. 3, n.2, p.261- 265, 2006.

LI, C. et al. The synthesis, antileukemic activity, and crystal structures of indirubin derivatives. **Bull. Chem. Soc. Jpn**, 69, 1621–1627 (1996).

LIU, C.X.; HE, W.G. Leukogenic effect of complex indigo powder. **Journal of Ethnopharmacology**, v.34, n.1, p.83-86, 1991.

MAJAK, W. et al. Three nitropopanoyl ester of glucose from *Indigofera linnaei*. **Phytochemistry**, v.31, n.7, p.2393-2395, 1992.

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

MARKO, D., SCHÄTZLE, S., FRIEDEL, A., GENZLINGER, A., ZANKL, H., MEIJER, L., EISENBRAND, G. **Br. J. Cancer**. 84, 283-289, 2001.

MARLOW, R., FREEMAN, S.J.. A comparison of the in vitro embryotoxicity of three lathrogens beta-APN, semicarbazide and isoniazid. **Teratology**. 38:24A, 1988.

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

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

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

MILLER, N., LEHANE, M.J. Peritrophic membranes, cell surface molecules and parasite tropisms within arthropod vectors. **Parasitol Today**. 9(2): 45-50, 1993.

MINAMI, Y.; KANAFUJI, T.; MIURA, K. Purification and characterization of a β glucosidase from *Polygonum tinctorium* which catalyzes preferentially the hydrolysis of indican. **Biosci.Biotech.Biochem.**, v.60, p.147-149, 1996.

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

MULLA, M.S.; TIANYUN, S. Activity and biological effects of neem products against arthropods of medicinal and veterinary importance. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v.15, n.2,p.133-52, 1999.

MURUGAN, K., MURUGAN, P., NOORTHEEN, A. Larvicidal and repellent potential of *Albizzia amara* Boivin and *Ocimum basilicum* Linn against dengue vector, *Aedes aegypti* (insecta: Diptera: Culicidae). **Bioresource Technology**. 98(1): 198-201, 2007.

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

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

OBERTHUR, C. et al. The Elusive Indigo Precursor in Woad (*Isatis tinctoria* L) Identification of the Major Indigo Precursor, Isantanol A, and a Structure of Isantanol B. **Chemistry and Biodiversity**. V 1, p 174-182, 2004.

O'PESSOA, C. **Testes “in vivo” e “in vitro” para avaliação da citotoxicidade e atividade antitumoral de plantas do nordeste brasileiro**. Ceará: Universidade Federal do Ceará, 1992. Tese de Mestrado.

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

PALSSON, K.; JAENSON, T.G.T. Plant products used as mosquito repellents in Guinea Bissau, West Africa. **Acta Tropica**, v.72, p.39-52, 1999.

PETERS, W., BRADSHAW, S.D., BURGGREN, W., HELLER, H.C., ISHII, S., LANGER, H., NEUWEILER, G., RANDALL, D.J. Peritrophic membranes. **Zoophysiology**. Berlin: Springer-Verlag, 1992.

PINHEIRO, V.C.S., TADEI, W.P. Evaluation of the residual effect of temophos on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. **Cad. Saúde Pública**. 18: 1529-1536, 2002.

POPPLEWELL, B. W., PERKIN, A. G. Indirubin. **Journal of the Chemical Society**, Part 1, 97:1460–75, 1910.

POUPARDIN, R., REYNAUD, S., STRAD, C., RANSON, H., VONTAS, J., DAVID, J.P. Cross- induction of detoxication genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. **Insect Biochem Mol Biol**. 38(5): 540-51, 2008.

RIBEIRO, I. M. S.; SILVA, M. A.; RANGEL, J. H. A. **Levantamento botânico de leguminosas forrageiras nativas da bacia leiteira do Estado de Alagoas**. Maceió: EPEAL -Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Alagoas (Comunicado Técnico), 1984.

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

RIET-CORREA, F. **Comunicação pessoal**. Pelotas: Lab. Diagnóstico/ UFPel, 2000.

RODRIGUEZ-KÁBANA, R. et al. Bahiagrass for the management of *Meloidogyne arenaria* in peanut. **Annals of Applied Nematology**, v.2, p.110-114, 1988.

ROIG, T.; MESA, J.T. Plantas Medicinales, Aromaticas y Venenosas de Cuba. **Habana: Editorial Científico-Técnico**, v.5, p. 163, 1974.

SALVIOLI, S., SIKORA, E., COOPER, E.L., FRANCESCHI, C. Curcumin in Cell Death Processes: A Challenge for CAM of Age-Related Pathologies. **eCAM**, 4(2): 181–190, 2007.

SHAALAN, E.A.S. et al. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environment International**, v.31, p.1149 -66, 2005.

SILVA, J.J.; MENDES J. Effect of diflubenzuron on stages of *Hematobia irritans* (L.) (Diptera,Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p.679-82, 2002.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. 5.ed. Porto Alegre: UFRGS, 173p, 1998.

TELLAM, R.L., WIJFFELS, G., WILLADSON, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochem Mol Biol**. 29(2): 87-101, 1999.

VAREJÃO, J. B. M., SANTOS, C. B., REZENDE, H. R., BEVILACQUA, C. L., FALQUETO, A. Criadouros de *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (Linnaeus, 1762) em bromélias nativas na Cidade de Vitória, ES. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 3, p. 238-240, mai-jun, 2005.

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

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

WANG, P., GRANADOS, R.R. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancing. **Proc. Natl. Acad. Sci**. 4: 6977-6982, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality assurance and safety of medicines**, 3:23, 2009.

WOUTERS, J., ROSARIO-CHIRINOS, N. Dye Analysis of pre-columbian Peruvian textiles with Hight-Performance Liquid Chromatography and diode-array detection. **Journal of the American Institute for Conservation**, v. 31, n. 2, pp. 237 to 255, 1992.