

Biologica brasilica 1 (1): 43-60 (1989).

CONTRIBUIÇÃO FARMACOLÓGICA E QUÍMICA PARA CARACTERI
ZAÇÃO DAS SAPONINAS PRESENTES NO *FELICIUM DECIPIENS*
THW.

Edvaldo Rodrigues de Almeida
Silene Carneiro do Nascimento
Maria da Salete Barros Cavalcanti
Alda de Andrade Chiappeta
Departamento de Antibióticos
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Pernambuco
Cidade Universitária, CEP 50.739
Recife, Pernambuco, Brasil.

Resumo

Felícium decípiens Thw. é uma planta da família das *Sapindaceae* originária do Ceilão e conhecida popularmente como "felício" ou "amendoim de raposa". Em virtude de algumas saponinas apresentarem propriedades antiinflamatórias, analgésicas, antimicrobianas e ainda sobre o sistema nervoso central é que resolveu-se continuar os estudos iniciados por Wandscheer e Mello sobre a saponina do *Felícium*, procurando caracterizar farmacologicamente as saponinas presentes, através dos seguintes testes: DL 50 em camundongos e em peixes; teste geral de atividade em camundongos; ação em coração isolado de sapo, reto abdominal do mesmo animal, duodeno isolado de coelho, pressão arterial de gato, índice hemolítico; ação citotóxica em cultura de células KB e ainda o teste específico para saponinas. Os resultados obtidos mostraram que o efeito produzido pela saponina do *Felícium* ocorre possivelmente através da ação direta nas membranas celulares.

Summary

Pharmacological and chemical contribution to the characterization of saponins present in *Felícium decípiens* Thw.

Feliciium decipiens Thw is a plant of the family of the *Sapindaceae*, originally from Ceylon and popularly known as "felicio" or "fox's peanuts". Because of the anti-inflammatory, analgesic, anti-microbial action of some of the saponines and their influence in the central nervous system it was resolved to continue the studies initiated by Wandscheer and Mello on the saponine of the *Feliciium*, attempting to characterize pharmacologically the saponines present through the following tests: DL 50 in rats and fish; general test of activities in rats the action on isolated heart and abdominal rectum of toads, on isolated duodenum of rabbits, the arterial pressure of cats, hemolytic indexes; cytotoxic action in KB cell cultures, and also the specific test for saponines. The results obtained indicate that the effect produced by the saponines of the *Feliciium* possibly occur through direct action in the cell membranes.

KEY WORDS: *Feliciium decipiens*, Saponines, Pharmacological characterization.

INTRODUÇÃO

As saponinas são geralmente, usadas por suas propriedades detergentes e podem apresentar ação hemolítica e ictiotóxica. Algumas são empregadas como expectorantes, antiinflamatórios, analgésicos, antimicrobianos e sobre o sistema nervoso central (Shibata, 1977; Camara, 1967, Tschesch e Wulff, 1965).

Feliciium decipiens Thw. é uma planta da família das *Sapindaceae*. As plantas desta família são ricas em saponinas geralmente do grupo triterpenóide (Hegnauer, 1973; Lapa et al, 1978; Moraes, 1980).

Wandscheer e Mello (1982), em seus estudos iniciais com a saponina do *Feliciium*, procurou verificar sua ação na glândula supra renal e no baço através do estudo morfológico e também seu efeito sobre

o sistema nervoso central de ratos. As informações, obtidas por esses autores, nos levaram a caracterizar farmacologicamente as saponinas presentes, como também verificar o seu grau de toxicidade em animais de experimentação.

MATERIAL E MÉTODOS

Extração

500g do fruto ou da casca foram colocados em um erlenmeyer de 3 litros, contendo cerca de 600 ml de metanol que foram agitados durante 4 horas. Após este tempo o sobrenadante foi retirado e colocado em um balão de 3 litros e ao resíduo adicionou-se nova quantidade de metanol (300 ml) que voltou a ser agitado durante o mesmo intervalo de tempo. Esse processo foi repetido até que a adição do éter dietílico na parte líquida não produzisse nenhuma turvação (Wattiez e Sternon, 1942). O material precipitado pelo éter dietílico foi chamado de saponina bruta (SB) e o rendimento tanto para o fruto quanto para a casca foi de 17%.

Teste específico para saponinas

O reagente utilizado para este teste foi de Liebermann-Burchard (Marini-Bettólo et al, 1981).

Toxidez aguda

Avaliou-se a dose letal 50% (DL 50) pela técnica de Miller e Tainter (1944), administrando-se a SB

por via intraperitoneal, i.p., em camundongos, utilizando-se 5 grupos de 6 animais, cada grupo, de acordo com o quadro abaixo:

Nº de animais	dose em mg	Log da dose	Nº de animais mortos	% mortalidade.	Probitos
6	8,56	0,932	0	0 (4,1)	3,2
6	11,12	1,046	1	16,6	4,0
6	14,45	1,159	3	50,0	5,0
6	18,78	1,273	4	66,6	5,3
6	24,41	1,387	6	100,0	6,7

Teste geral de atividade

Para o teste geral de atividade foram utilizados camundongos, pesando em média 25g. A SB foi injetada por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 7 e 15 mg/kg. Os animais foram observados em uma superfície plana medindo 1,50 m², com suas partes laterais elevadas até uma altura de 20 cm, durante 3 horas (Malone, 1977). Os animais controles receberam soro fisiológico em volume correspondente ao maior volume empregado.

Coração isolado do sapo

O animal foi imobilizado por destruição do eixo cerebro-espinhal, e, em seguida, o coração foi exposto e aberto o saco pericárdio. A técnica de perfusão foi a de Clark, modificada por Figueira, segundo Velazques (1953), com líquido nutritivo Ringer-Batráquio.

para 2 ml com solução-tampão. Após 24 horas anotou-se em qual tubo houve hemólise total.

O índice hemolítico é o número que exprime o grau de diluição, em ml da SB, suficiente para causar hemólise total.

Cultura de célula KB

O método usado é o mesmo adotado pelo National Cancer Institute (N.C.I.) (Geran, 1972; Oyama, 1956; Eagle, 1959). As células são cultivadas em meio básico de Eagle (1955) com 10% de soro fetal bovino, mais antibióticos (Penicilina, Streptomina e Kanamicina 100 µg/ml). São repicadas no dia anterior, em meio noestrato, removidas com 0,25% de tripsina e diluídas no meio a 30.000 células por mililitro. A substância-teste é diluída no meio completo a uma concentração de 100, 10, 1 e 0,1 µg/ml e um controle positivo com 6-Mercaptopurina, $DI_{50} = 0,5 \pm 0,05$ µg/ml. O material é incubado a 37°C por 72 horas em uma atmosfera com 5% de CO₂. A atividade da substância-teste é avaliada mediante a dose resposta da toxicidade segundo protocolo 1600 do N.C.I. (Geran, 1972; Oyama, 1956; Eagle, 1959).

RESULTADOS

Teste específico para saponinas

O reagente utilizado para este teste foi o de Liebermann-Burchard, que apresentou resultado positivo.

Recto abdominal do sapo

O animal foi imobilizado como na preparação anterior, e o músculo dessecado e livre de suas aponeuroses (Carlini, 1975).

O órgão foi colocado numa cuba de 10 ml contendo Ringer-Batrâquio e aerado na temperatura ambiente. Após 30 minutos de repouso as contrações isotônicas do músculo foram registradas através de uma alavanca inscritora frontal com amplificação de 6x e uma carga de 2g.

Pressão arterial no gato (P.A.)

Para obtenção do registro da P.A. utilizaram-se gatos de ambos os sexos, pesando em média 2.500g. Os animais foram anestesiados com hidrato de cloral, na dose de 300 mg/kg por via intraperitoneal (i.p.). Uma vez anestesiados, os animais tiveram a veia ilíaca externa canulada, e utilizada para administrar as drogas. A pressão arterial foi medida pelo método direto através da canulação da carótida, sendo o registro da respiração feito também segundo a técnica descrita por Burn (1952).

Duodeno isolado do coelho

O animal foi sacrificado por forte pancada na região occipito-cervical. Após a abertura da cavidade abdominal foi localizada a primeira porção após o estômago e seccionado um segmento de aproximadamente 7 cm e colocado em um becker, contendo solução

nutritiva de tiróide a $\pm 35^{\circ}\text{C}$. A luz do órgão foi lavada com a solução e em seguida tomou-se um fragmento de 4 cm do órgão, uma das extremidades foi fixada no fundo da cuba e a outra presa através de um fio à alavanca inscritora frontal. O órgão foi mantido no banho-maria à temperatura controlada, $\pm 37^{\circ}\text{C}$ e aerado (Carlini, 1973).

Ictiotoxicidade

Os peixes (guarus e lebistes), provenientes de um lago artificial existente na área posterior ao Departamento de Antibióticos da UFPE, foram mantidos num tanque de mil litros de capacidade e na ocasião do ensaio foram distribuídos 10 peixes em cada frasco de vidro de um litro, contendo 300 ml de água (Valle, 1967; Miller e Tainter, 1944). Os frascos foram mantidos a temperatura ambiente e o pH da água foi mantido em 6, aproximadamente. A SB foi adicionada diretamente nos frascos e as concentrações variaram de 6 a 12,3 mg/300ml.

Índice hemolítico

O método usado foi o de Wasick (1944/5), só que o volume do líquido em cada tubo importou em 2 ml e a SB foi dissolvida em solução-tampão isotônica com sangue, de pH 7,4. Numa série de tubos de ensaio foi, em cada um, introduzido 1 ml de sangue diluído, sendo depois misturados com diferentes volumes de SB, com diferentes concentrações, abrangendo volumes de 0,1 até 1,0 ml, completado em cada tubo, o volume

Toxidez aguda (DL₅₀)

A dose letal da SB em camundongos, foi de $16 \pm 2,2$ mg/kg, como pode-se observar na Figura 1.

Teste geral de atividade

Conforme mostra a Tabela 1, os animais injetados com a SB, apresentaram irritabilidade, aumento da atividade motora e agressividade, isto logo aos 5 minutos. Aos 10 minutos apresentaram comportamento estereotipado, e a partir dos 60 minutos, houve diminuição da atividade motora sem alterar a agressividade e a irritabilidade, isto, até o final dos 120 minutos.

Tabela 1 - Ação da SB no teste geral de atividade, em camundongos.

Sinais observados		Tempo de observação em minutos				
		5	10	30	60	120
Aumento das respostas aos estímulos externos.	Irritabilidade	+	+	+	+++	+++
	Agressividade	+	++	+++	+	+++
Aumento da atividade motora		+	++	+++	+	-
Estereotipia		-	+	+	+++	++

Intensidade das respostas

A avaliação foi feita subjetivamente, atribuindo-se os seguintes índices: (-) ausência de sinal;

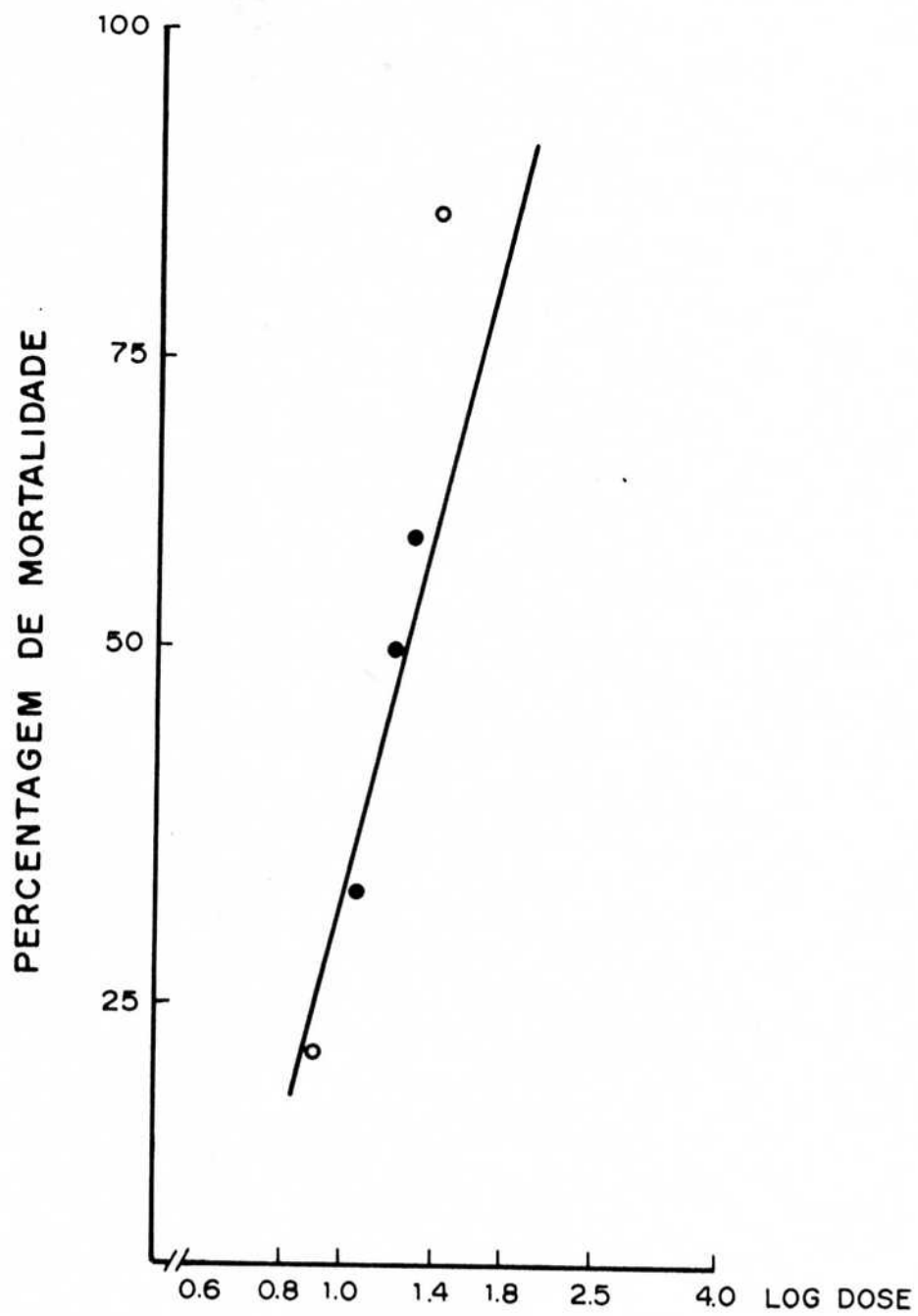


Figura 1 - Determinação da dose letal 50% da saponina, em camundongos.

(+) pouca intensidade; (++) média intensidade; (+++) grande intensidade. O grupo controle permaneceu dentro dos padrões normais de comportamento.

Coração isolado do sapo

A SB nas doses de 1,0 à 1,5 mg/0,5ml produziu no coração, efeito inotrópico e cronotrópico negativo, seguido de parada do órgão em sístole, conforme pode-se observar na Figura 2.

Reto abdominal do sapo

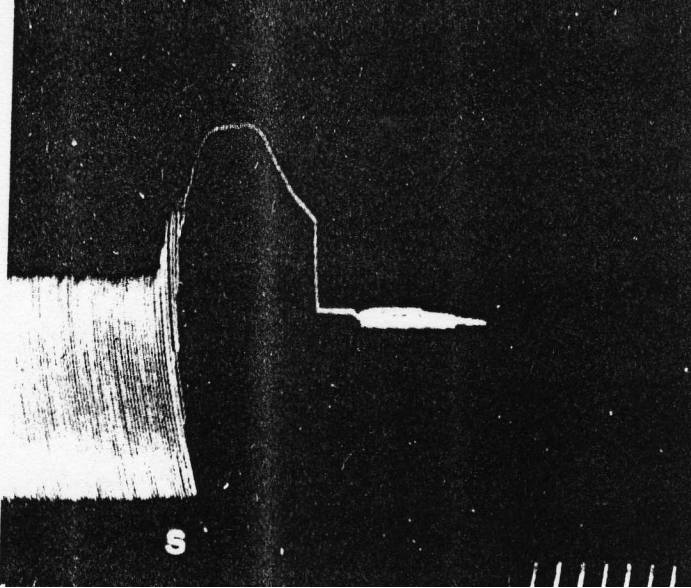
As doses de 1,6 à 2,0 mg/0,5ml da SB produzem uma estimulação do músculo, que não foi bloqueado na presença de galamina, na dose de 4 µg/0,5ml como pode-se observar na Figura 3.

Pressão arterial no gato

No registro da P.A. em conjunto com a respiração, como mostra a Figura 4, a SB produziu hipotensão com apnéia seguida, após alguns minutos, de morte do animal, nas doses de 8,0 e 10 mg/kg.

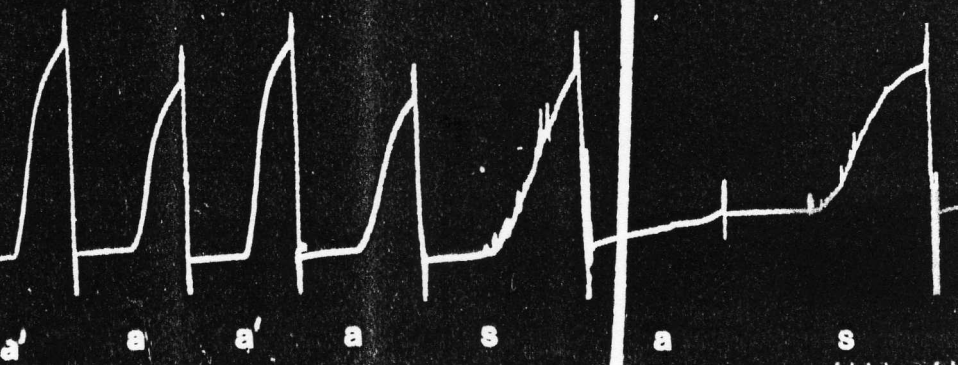
Índice hemolítico

O efeito hemolizante de SB, que exprime o grau de diluição suficiente para produzir hemólise total, foi observado na concentração de 1:1000.



A

B



Duodeno isolado do coelho

Na concentração de 1,0 mg/0,5 ml a SB produziu contração do órgão. A adição da atropina na dose de 2 µg/0,5 ml não modificou o fenômeno, conforme pode-se observar na Figura 5.

Ictiotoxicidade

Após a adição de SB à água dos frascos, na concentração de 6 à 12,3 mg/300ml, os peixes apresentaram redução da motilidade espontânea e se localizaram no fundo dos frascos, apenas com movimentos respiratórios e das nadadeiras e ao final de 24 horas de observação a DL 50 foi de $8 \pm 1,0$ mg/300ml, como pode-se observar na Figura 6.

Cultura de células KB

A SB apresentou, frente à célula KB, uma DI_{50} (dose que inibe 50% do crescimento celular) em torno de 6 µg/ml.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os sinais produzidos pela SB no teste geral de atividade, em camundongos, sugerem uma ação central (Wandscheer e Mello, 1982).

No coração isolado do sapo e na pressão arterial do gato verificou-se apenas o efeito no órgão, este, entretanto, semelhante a uma ação em receptores muscarínicos; esta suposição foi eliminada após

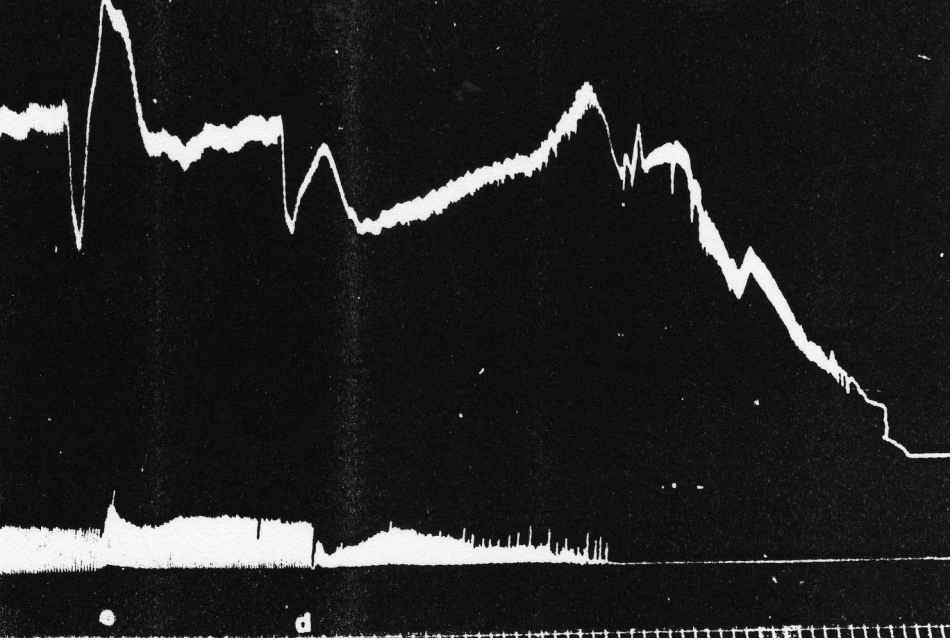


Figura 4 - Registro da pressão arterial e da respiração em gato. Em (c) foi administrado 8 mg/kg de SB e em (b) 10 mg/kg da SB. Tempo: 30 segundos.

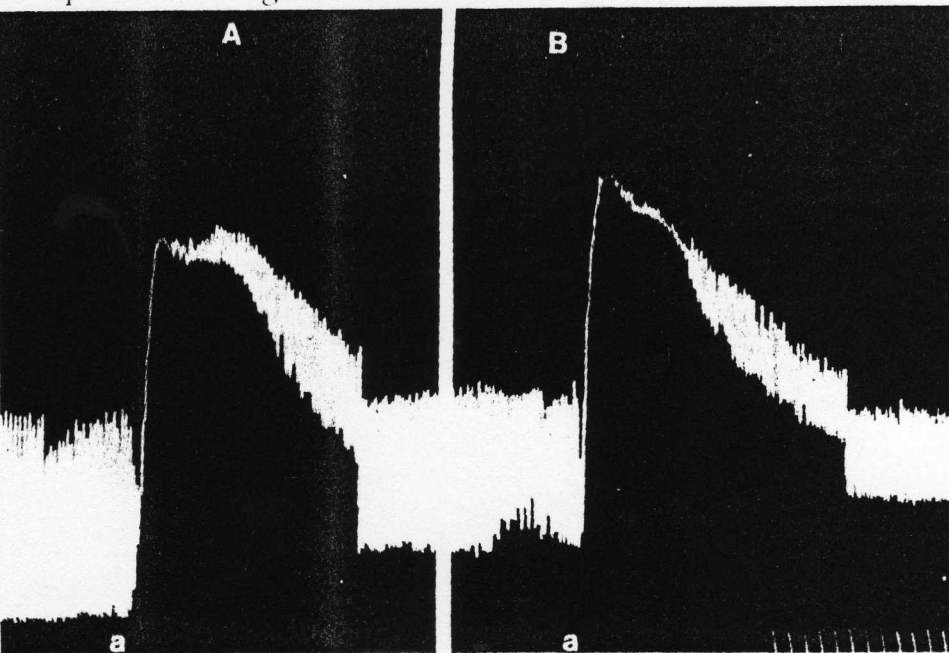


Figura 5 - Ação da SB no duodeno isolado do coelho. Em (a) 1,0 mg/0,5 ml da saponina foi adicionada ao banho. Entre A e B adicionou-se

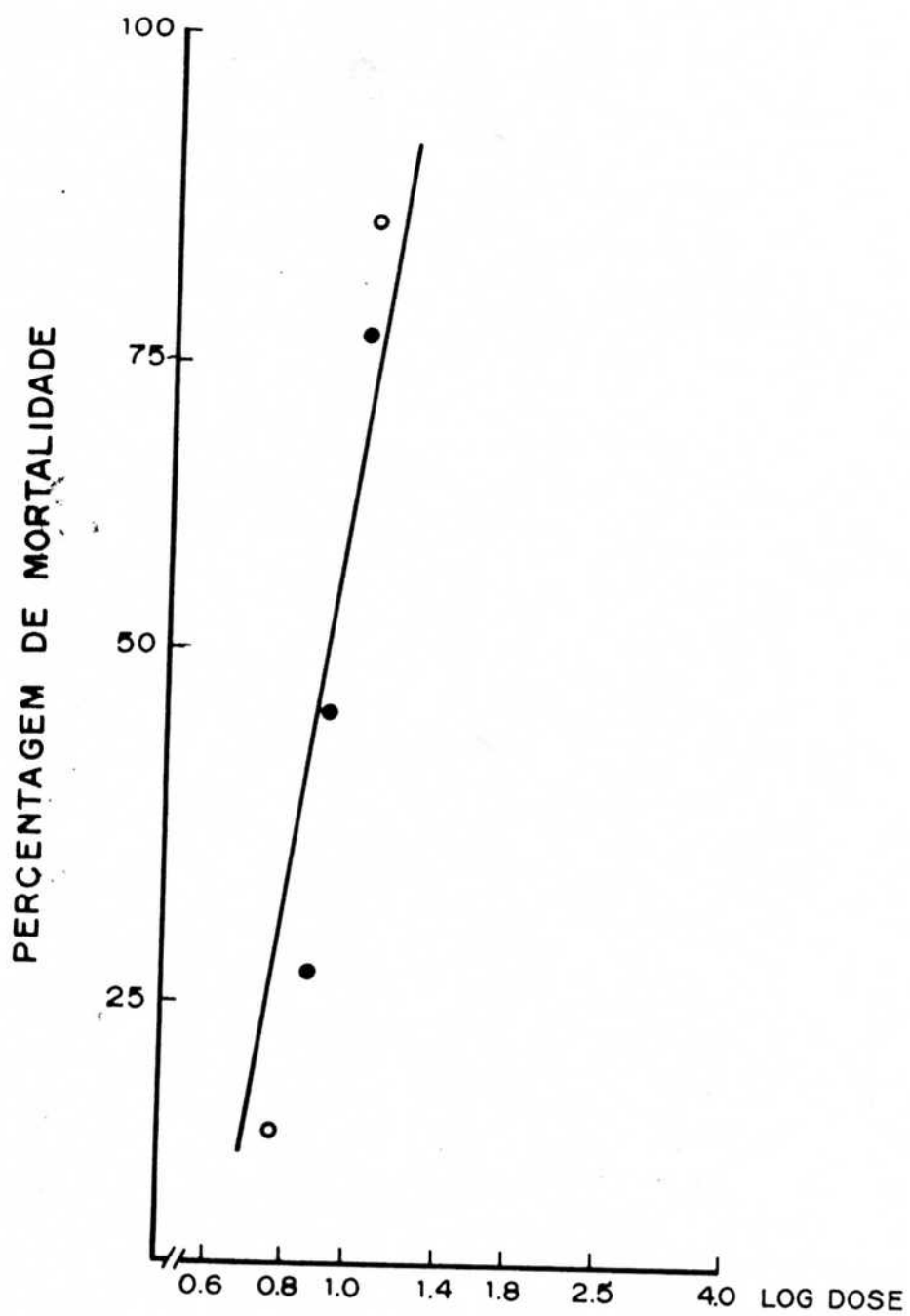


Figura 6 - Determinação da dose letal 50% da saponina, em peixes.

verificação da ação no duodeno do coelho, no qual o fenômeno não foi bloqueado pela atropina. Ao se estudar a ação da SB no reto abdominal do sapo, procurou-se verificar se a estimulação do órgão seria uma ação específica nos receptores nicotínicos, através da ação bloqueadora do efeito pela galamina. Entretanto, nossos resultados demonstraram que a ação não ocorre nos receptores.

Os ensaios realizados com peixes, eritrócitos e cultura de células KB sugerem que os efeitos produzidos pela SB nos órgãos isolados se dá possivelmente através da ação nas membranas celulares, alterando a permeabilidade em virtude de diminuir a tensão superficial (Vogel, 1963).

AGRADECIMENTOS

José Francisco dos Santos e Isnaldo Paixão Vieira Ribeiro, pela valiosa assistência técnica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURN, J. H. 1952. **Practical Pharmacology**. Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- CAMARA, S. A. 1967. Princípios vegetais. In: **Manual de Farmacologia Prático**. São Paulo, Ed. Atheneu, 47-48.
- CARLINI, E. A. 1973. **Farmacologia Prática Sem Aparentagem**. Ed. Savier, São Paulo, pp. 50-53.
- EAGLE, H. 1955. Propagation in a fluid medium of a human Epidermoid Carcinoma strain KB. **Proc. Soc. Exper. Biol. Med.** 89: 362.
- 1959. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**. 130: 432.
- GERAN, R. I. 1972. Protocol for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. **Cancer Chemother. Rep.** 3: 1-103.
- HEGNAUER, R. 1973. Sapindaceae. In: **Chemotaxonomia Derplanzen**. Stuttgart, Birkhauser, 6: 271-286.
- LAPA, A. J.; TEIXEIRA, J. R.; CADEN SOUCCAR & VALLE, J. R. 1978. The Pharmacology of Timbús. Toxic Plants Used to Fish. In: **Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, 5, São Paulo.
- MALONE, M. H. 1977. Pharmacological Approaches to Natural Provet Screening and Avaluation. In: **New Natural Products and Plant Drugs With Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**. Berlin, Springer-Verlag, 23-53.

- MARINI -BETTÒLO, G. B.; NICOLETTI, M.; GALEFFI, C. and MESSANA, I. 1981. Plant Screening by Chemical and Chromatographic Procedures under fields conditions. **Journal of Chromatography**, 213: 113-127.
- MILLER, C. & TAINTER, M. L. 1944. Estimation of the ED50 and its error by means of logarithmic probit graph paper. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 57 (2):261-64.
- MORAES, H. R. 1980. Contribuição ao estudo farmacognóstico do fruto do *F. decipiens*, Thw. Recife. (tese-UFPE - Departamento de Farmácia).
- OYAMA, V. & EAGLE, H. 1956. Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 91. 305-307.
- SHIBATA, S. 1977. Saponins with Biological and Pharmacological activity. In: **New Natural Products and Plants Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical activity**. Berlin, Springer-Verlag, 177-196.
- THSCHESCH, R. and WULFF, G. 1965. Über die antimikrobielle Wirksamkeit von saponinen. **Z.Naturforsch** 20b, 543.
- VALLE, J. R. 1967. Estudo sobre a Maconha Nacional (*Canabis sativa*). II - Emprego de guarus e lebetes no ensaio de preparações do cânhamo e efeitos de algumas drogas-psicotrópicas. **An. Acad. Bras. de Ciências**, 39: 445-452.

- VELÁSQUES, B. L. 1953. **Terapêutica com seus fundamentos Farmacologia Experimental.** Barcelona. 11^o ed. Científica Médica, 433.
- VOGEL, G. 1963. Pharmacologie von Saponinen. **Planta Medica.** 2: 363.
- WANDSCHEER, D. E. & MELLO, A. C. Ação farmacológica de saponinas isoladas do *P. decipiens*. In: **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 7. Belo Horizonte.
- WASICK, R. 1944/5. As raízes de *Polygala cyparissias*, A. ST HILL. Um sucedâneo de pleno valor das raízes da *Polygala senega*. **An. Fac. Farm. Odont. da USP.** 4:194.
- WATTIEZ, N. & STERNON, F. 1942. **Éléments de chimie végétale**, 12^o edition, Masson et C^{ie}, editeurs.