

ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DAS FOLHAS DA *SESBANIA VIRGATA* (CAV.) PERS.M.M. Braggio¹, M.E.L. Lima², E.A. Veasey³, M. Haraguchi¹¹Centro Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252, CEP 04014-002, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: braggio@biologico.sp.gov.br

RESUMO

As atividades farmacológicas do sumo liofilizado (SL) das folhas da *Sesbania virgata* (Sv) (Cav.) Pers. foram estudadas *in vivo*. A administração oral do SL de 0,5 a 2 g/kg em ratos e camundongos produziu ptose, reduziu a motilidade espontânea e dispnéia. A DL₅₀ foi de 11,30 (10,04↔12,71) g/kg, indicando ausência de toxicidade. O tratamento oral com SL (1 e 2 g/kg) em camundongos não alterou a latência mas aumentou a duração do sono induzido pelo pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). A atividade antinociceptiva do SL foi avaliada pelas contorções abdominais induzidas por ácido acético e pelo teste da formalina; enquanto que atividade antiinflamatória foi verificada pela indução do edema por óleo de cróton em orelhas e por carragenina nas patas de camundongos, respectivamente. O SL (1 e 2 g/kg) causou diminuição dose-resposta das contorções abdominais, inibiu em 91 e 89%, a 2ª fase da resposta no teste da formalina, reduziu o edema induzido por óleo de cróton em 58 e 61% e diminuiu em 24 e 31% o edema da pata induzido por carragenina, respectivamente. Os resultados demonstraram que o tratamento oral em camundongos com *S. virgata* diminui a reação ao estímulo doloroso e reduz o edema inflamatório.

PALAVRAS-CHAVE: *Sesbania virgata*, toxicidade, atividades analgésica, antiinflamatória.

ABSTRACT

PHARMACOLOGICAL ACTIVITIES OF LEAVES FROM *SESBANIA VIRGATA* (CAV.) PERS. Pharmacological activities *in vivo* of the *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. lyophilized leaf juice (Sv-SL) were studied. Oral administration of 0.5 to 2 g/kg of Sv-SL to rats and mice induced ptosis, reduced spontaneous motility and dyspnoea despite that the LD₅₀ value was found to be 11.30 (10.04↔12.71) g/kg. Treatment in mice with Sv-SL (1 and 2 g/kg) did not alter the latency and increased sleeping time induced by sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.). Antinociceptive activity of Sv-SL was evaluated by nociception assays of acetic-induced writhing and by formalin tests. Antiinflammatory activities were evaluated by tests of croton oil or carrageenin induced edemas, in ear and paw of mice, respectively. Sv-SL (1 and 2 g/kg) caused a dose-related reduction of writhing responses. At the same dose, Sv-SL caused: a) inhibition of 91 and 89%, respectively in the formalin test (2nd phase); b) reduction of 58 and 61%, respectively in ear edema induced by croton oil and c) decrease of 24 and 31%, respectively in paw edema induced by carrageenin. Thus, *S. virgata* was able to decrease the reaction to pain stimuli and to inhibit the inflammatory edema.

KEY WORDS: *Sesbania virgata*, toxicity, antinociceptive, antiinflammatory activities.

INTRODUÇÃO

A leguminosa *Sesbania virgata* (Sv) da família Papilionoideae, conhecida popularmente como "saranzinho", "mãe-josé" e "feijãozinho", é um arbusto perene de 2 a 4 anos, com 1 a 4 m de altura, flor e fruto durante quase todo ano, ocorrendo em beira de estradas, campos alagáveis, solos arenosos ou argilosos e jardins. A Sv é nativa da região sul das Américas sendo distribuída nas regiões centro-oeste, sudeste e sul do

Brasil. O seu uso está restringido ao fornecimento de lenha e produção de mel. Na Argentina, as suas sementes torradas são empregadas como substituintes do café (POTT & POTT, 1994).

As espécies do gênero *Sesbania* tem rápido crescimento e capacidade de fixar nitrogênio mesmo de solos deficientes, permitindo seu uso como adubo verde e nas agroflorestas (NDOYE *et al.*, 1990). VEASEY *et al.* (1999), ao estudar vários acessos de algumas sesbanias verificou grande potencial protéico nas

²Bolsista da FAPESP.³Departamento de Genética (ESALQ/USP).

folhas da espécie *S. virgata* com teores de 15 a 28% comparáveis a *S. sesban*, forrageira amplamente utilizada como suplemento protéico para ruminantes nas regiões tropicais da África e Austrália (GUTTERIDGE, 1994; GUTTERIDGE *et al.*, 1995). Por outro lado, as favas de Sv produziu intoxicação em criança com sintomas de diarreia em uma creche de São Paulo, sendo confirmada experimentalmente em cobaias (TSUHAKE *et al.*, 1989). Outra espécie, como *S. drummondii*, conhecida como tóxica para bovinos, caprinos, suínos e aviários (FLORY & HEBERT, 1984), contém substâncias biologicamente ativas como os alcalóides sesbanimidás A, B e C, com elevada atividade antitumoral (POWELL *et al.*, 1984). Apesar da suspeita das substâncias nocivas existentes na *Sesbania virgata*, o presente trabalho verificou além da toxicidade, os efeitos analgésico e antiinflamatório do sumo liofilizado das suas folhas.

MATERIAL E MÉTODOS

A espécie *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. foi cultivada no Instituto de Zootecnia em Nova Odessa, SP, e identificada pelo Prof. Reinaldo Monteiro do Instituto de Biociências da UNESP, Rio Claro, SP, cuja excisada foi depositada no Herbarium Rio Clarense sob o número HRCB 17378. As suas folhas frescas (3,9 kg) foram trituradas e prensadas obtendo-se um líquido verde escuro que após a liofilização forneceu o sumo liofilizado, SL (65,8 g = 1,7% de rendimento).

Os testes foram realizados em camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus norvegicus*), adultos, de ambos sexos, com peso de 25 a 30 g e 120 a 150 g, respectivamente, provenientes do biotério do Instituto Biológico. Os animais foram previamente mantidos no biotério experimental em condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h) com livre acesso a ração e água. Eles foram submetidos a jejum de uma noite antes dos tratamentos.

Para as observações dos efeitos farmacológicos gerais, os camundongos e ratos separados em grupos controle e experimental foram tratados com o veículo (água, v.o. e/ou salina 0,9% i.p.) e com o SL (0,1 a 5 g/kg, v.o., i.p.) respectivamente e verificados nos primeiros 30 min (em intervalos de 5 min) seguidas de 1, 8, 24, 48 h e 7 dias (MALONE, 1977). A atividade tóxica foi avaliada em camundongos que receberam o SL por gavagem (1 a 15 g/kg) permanecendo em observações por 14 d. A DL_{50} foi determinada pelo método de THOMPSON & WEIL (1952).

Os camundongos foram tratados 30 ou 60 min antes com SL (1 e 2 g/kg, v.o.) ou veículo (controle) e submetidos aos estudos farmacológicos. A atividade depressora do sistema nervoso central (SNC) foi

investigada através da medida do tempo de sono induzido pelo pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) medindo-se o tempo de latência e a duração do sono (CARLINI *et al.*, 1986). A atividade analgésica foi avaliada pelo número de contorções abdominais induzidas com ácido acético 0,8% (0,1 mL/10g, i.p.) durante 30 min (KOSTER *et al.*, 1959) e pela injeção subplantar de 20 μL de formalina 3% (formaldeído 1,2% em tampão fosfato em salina), para a medida da reatividade em segundos(s) dos animais em lambar ou morder a pata de 0-5 min (1ª fase) e 15-30 min (2ª fase) após injeção de formalina (HUNSKAAR *et al.*, 1985). A indometacina (10 mg/kg, v.o.) foi usada como controle positivo para ambos os testes. A atividade antiinflamatória foi testada no edema agudo da orelha após aplicação tópica de 10 μL de óleo de cróton (2,5% em acetona) tendo como controle a orelha contralateral administrado com o mesmo volume de acetona. Após 4 h os animais foram sacrificados e removidos discos de 5 mm de diâmetro das orelhas e pesados (SCHIANTARELLI *et al.*, 1982). A diferença entre o peso das orelhas foi tomada como o edema induzido por óleo de cróton. O controle positivo utilizado foi a dexametasona (1 mg/kg, v.o.). O outro teste realizado foi o edema de pata induzido por 50 μL de carragenina a 1% (subplantar) e na pata contralateral foi injetado igual volume de salina como controle (WINTER *et al.*, 1962). Após 3 horas os animais foram sacrificados e retirados as patas na região do maléolo lateral e pesadas. A indometacina (10 mg/kg, v.o.) foi usada como controle positivo do teste.

Os resultados foram expressos como médias \pm erro padrão das médias. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Newman-Keuls. Valores de p menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados indicativos de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A administração do SL em camundongos e ratos produziu contorções abdominais nas doses 0,5 a 1 g/kg, i.p. e acima de 2 g/kg por via oral. Também foram observados diminuição da atividade motora espontânea, ptose, ataxia, sugerindo depressão do SNC, além de prostração, dispnéia, diarreia, piloereção e convulsão. Nas doses acima de 8 g/kg ocorreram mortes após 6 ou 12 h da administração. Os efeitos foram dependentes da via de administração, proporcionais às doses e tempo de observação. Após a morte dos animais, exames macroscópicos não revelaram lesão. O tratamento com o SL (0,1 a 2 g/kg, v.o.) em camundongos não alterou o comportamento e a DL_{50} foi de 11,30 (10,04 \leftrightarrow 12,71) g/kg, n = 6, indicando ausência de toxicidade aguda segundo critérios de Loomis, 1982.

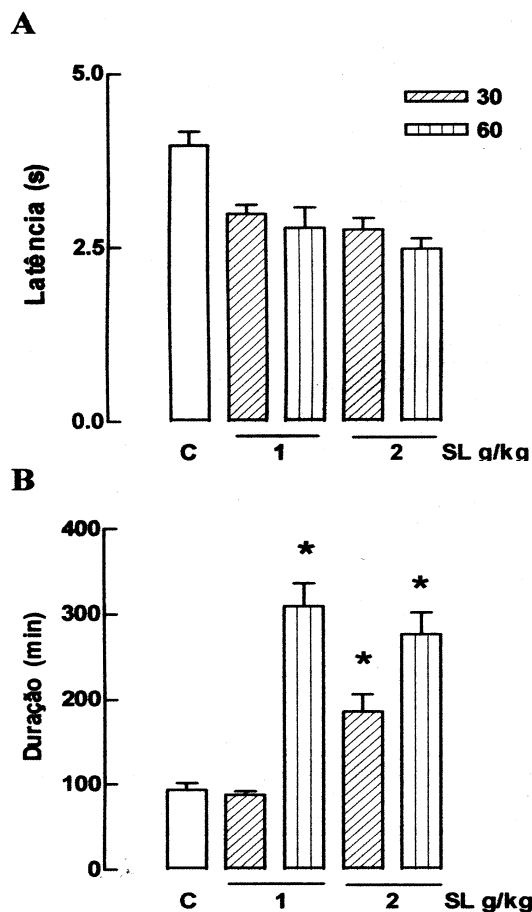


Fig. 1 - Efeito do tratamento prévio (30 ou 60 min) com o veículo (C = controle) e o SL da *S.virgata* (1 e 2 g/kg, v.o.) na latência A e duração B do sono induzido por pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) em camundongos. As colunas e barras verticais representam a média \pm e.p.m. (* $p < 0,01$).

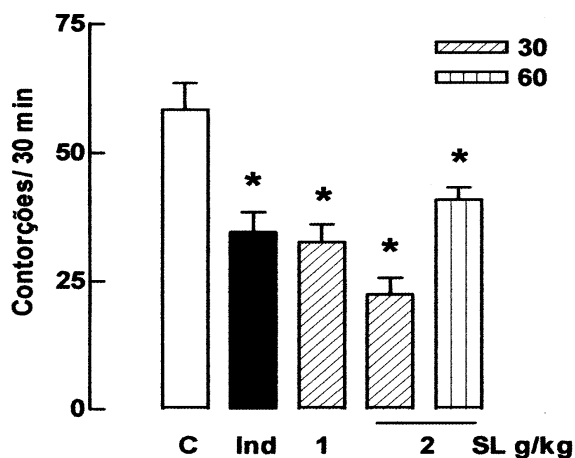


Fig. 2 - Contorções induzidas pelo ácido acético (0,8%) em camundongos tratados previamente (30 ou 60 min), veículo (C), indometacina (Ind, 10 mg/kg, v.o.) e com o SL da *S.virgata* (1 e 2 g/kg, v.o.). As colunas e barras verticais representam a média \pm e.p.m. (* $p < 0,01$).

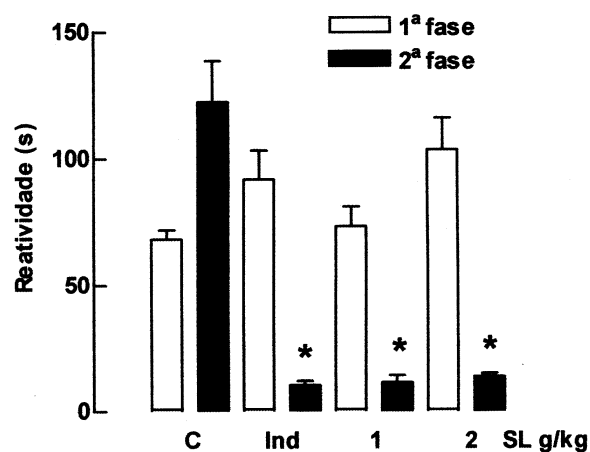


Fig. 3 - Reatividade subplantar de formalina (3%) em camundongos previamente tratados (30 min), veículo (C), indometacina (Ind, 10 mg/kg, v.o.) e SL da *S.virgata* (1 e 2 g/kg, v.o.). As colunas e barras verticais representam a média \pm e.p.m. (* $p < 0,001$).

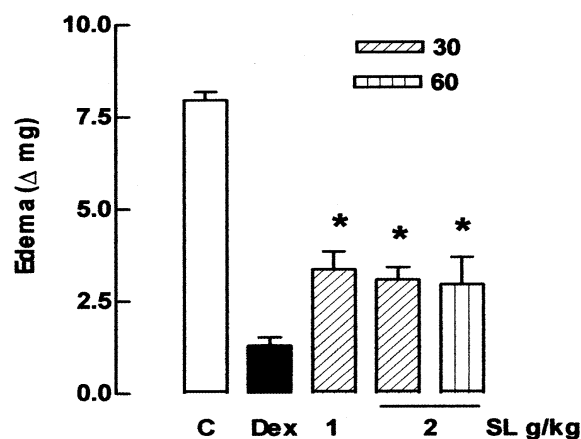


Figura 4. Edema de orelha induzido por óleo de crôton (2,5%) em camundongos previamente tratados (30 ou 60 min) com o veículo (C), dexametasona (Dex, 1mg/kg) e o SL da *S.virgata* (1 e 2 g/kg, v.o.). As colunas e barras verticais representam a média \pm e.p.m. (* $p < 0,001$).

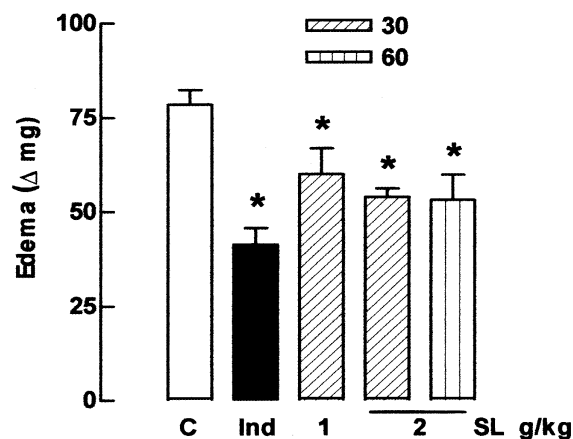


Fig. 5 - Edema de pata induzido por carragenina (1%) em camundongos previamente tratados (30 ou 60 min) com o veículo (C), indometacina (Ind, 10 mg/kg, v.o.) e o SL da *S.virgata* (1 e 2 g/kg, v.o.). As colunas e barras verticais representam a média \pm e.p.m. (* $p < 0,01$).

O efeito depressor do SNC foi confirmado em camundongos com o pentobarbital sódico, após o tratamento prévio de 30 ou 60 min do SL (1 e 2 g/kg) o qual potencializou a duração do sono induzido pelo barbiturato em 232; 99 e 196% respectivamente comparados aos animais tratados com o veículo ($C = 93,5 \pm 8,5$ min; $p < 0,001$; $n = 10$). Contudo, não alterou o tempo de latência (Fig. 1).

A atividade analgésica foi avaliada através de estímulos químicos induzidos por ácido acético e por formalina. O número de contorções abdominais produzidos pelo ácido acético em camundongos controles, acumuladas por 30 min, foi de $58,4 \pm 5,1$; o pré-tratamento (30 min) com o SL (1 g/kg) reduziu em 44% à semelhança do composto referência a indometacina (41%). Na dose de 2 g/kg, o SL administrado 30 e 60 min antes, inibiu o efeito em 62 e 30%, respectivamente, comparado ao grupo controle ($p < 0,01$; $n = 10$) (Fig. 2). No teste da formalina, a primeira fase (dor de origem neurogênica) não foi inibida. Os animais tratados com o veículo lambeiram e mordeiram a pata durante $122,4 \pm 16,5$ s na segunda fase do teste ($p < 0,001$; $n = 10$). Entretanto, a administração prévia (30 min) do SL, nas doses de 1 e 2 g/kg, reduziu a segunda fase de nociceção (dor de origem inflamatória) em 91 e 89%, respectivamente, seguindo um perfil semelhante ao da indometacina que inibiu 92% (Fig. 3).

O SL inibiu significativamente a dor produzida por ácido acético e formalina. Embora as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético representem um modelo de nociceção periférica, o qual consiste de estímulos de alta intensidade e a resposta nociceptiva de curta duração, este não é um modelo específico, uma vez que diferentes classes de substâncias também inibem as contorções. São elas: os hipotensores, depressores e estimulantes do SNC (HENDERSHOT & FORSAITH, 1959), anti-histamínicos (YEN, 1985) e antidepressivos tricíclicos (TAKAHASHI & PAZ, 1987). Portanto, a interpretação da redução da dor através do estímulo pelo ácido acético, deve ser efetuada de forma cautelosa em conjugação com outros testes. Por outro lado, o teste da formalina é mais específico e muito usado para o estudo de nociceção. A injeção de formalina produz resposta bifásica distinta: a primeira fase representa o efeito irritante da formalina nas fibras sensoriais do tipo C que caracteriza a dor neurogênica e a segunda fase é a dor inflamatória. Os analgésicos de ação central como a morfina, inibem as duas fases, enquanto que drogas de ação periférica, como os antiinflamatórios e corticóides inibem somente a segunda fase (HUSNKAAR & HOLE, 1987). Esta técnica é útil para detectar analgésicos do tipo aspirina além de ser capaz de dissociar dor do tipo inflamatório e não-inflamatório. Além disso, permite avaliar em animais a dor contínua de intensidade moderada

causada pela lesão do tecido e o papel dos sistemas endógenos na regulação da dor (TJOLSEN *et al.*, 1992). Os resultados obtidos com o SL indicam que o efeito antinociceptivo seria através de mecanismos semelhantes àqueles descritos para outras substâncias analgésicas/antiinflamatórias como aspirina e indometacina onde os efeitos analgésicos são descritos por inibição da síntese de prostaglandinas (FERREIRA & VANE, 1974) e diminuição da sensibilidade de receptores nociceptivos periféricos (BERKENKOPF & WEICHMAN, 1988).

O tratamento do SL (1 e 2 g/kg) em camundongos, 30 min antes do óleo de cróton, produziu inibição de 58 e 61%, respectivamente e para a dose de 2 g/kg, 60 min prévios ao estímulo inflamatório, a inibição foi de 63%. A injeção de dexametasona, controle positivo, teve redução de 84% ($C = 7,97 \pm 0,23$ mg, $p < 0,001$, $n = 8$) (Fig. 4).

A injeção de carragenina 1% produziu edema na pata do camundongo após 3 h ($C = 78,6 \pm 3,96$ mg; $n = 8$). A administração prévia (30 min) do SL (1 e 2 g/kg) apresentou redução do edema de pata em 24 e 31%, respectivamente. Para a dose de 2 g/kg, 60 min antes do estímulo, a inibição foi de 32%. A indometacina produziu redução do edema em 47% ($C = p < 0,001$) (Fig. 5).

Estes resultados determinam que o SL tem propriedade anti edematogênica/antiinflamatória comprovada pela significativa inibição do edema agudo nos dois modelos usados. O edema de orelha induzido por óleo de cróton, representa um modelo muito usado para estudar atividade antiinflamatória de drogas esteroidais e não esteroidais (TUBARO *et al.*, 1986), assim como o edema de pata por carragenina. Este último envolve a liberação de vários mediadores induzindo uma reação inflamatória em duas fases diferentes: a fase inicial que ocorre de zero até três horas após a injeção do agente flogístico, sendo atribuída a ação da histamina, serotonina e bradicinina (VINGER *et al.*, 1987) e a fase tardia que depende da produção de prostaglandinas dos tecidos (DI ROSA *et al.*, 1971). O SL mostrou uma inibição dose-dependente, isto indica que o ele poderia inibir diferentes aspectos que estariam envolvidos vários mediadores químicos da inflamação (histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas).

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostram que o sumo liofilizado das folhas frescas da *Sesbania virgata* administrado em camundongos por via oral tem um perfil farmacológico exibindo um acentuado efeito depressor do SNC refletido pela potencialização do sono barbitúrico; possui propriedades analgésicas de ori-

gem periférica e/ou central, porém este efeito é mais evidente na dor de origem inflamatória e, por fim, produz efeitos antiinflamatórios contra edemas induzidos por carragenina e óleo de cróton.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o auxílio financeiro recebido da FAPESP (Proc.99/02500-1) e a valiosa colaboração dos estagiários Sérgio Luis Battistini e Sérgio Kiyoshi Yamada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERKENKOPF, J.W. & WEICHTMAN, B.M. Production of prostacyclin in mice following intraperitoneal injection of acetic acid, phenylbenzoquinone and zymosan: Its role in the writhing response. *Prostaglandins*, v.36, p.693-709, 1988.
- CARLINI, E.A.; CONTAR, J. DE D.P.; SILVA FILHO, A.R.; SILVEIRA FILHO, N.G. DA; FROCHTENGARTEN, M.L.; BUENO, O.F. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.*, v.17, n.1, p.37-64, 1986.
- DI ROSA, M.; GROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and tujentine. *J. Pathol.*, v.104, p.15-29, 1971.
- FERREIRA, S.H. & VANE, J.R. New aspects of the mode of action of non-steroid antiinflammatory drugs. *Annu. Rev. Pharmacol.*, v.14, p.57-73, 1974.
- FLORY, W. & HEBERT, C.D. Determination of the oral toxicity of *Sesbania drummondii* seeds in chickens. *Am. J. Vet. Res.*, v. 45, n.5, p.955-958, 1984.
- GUTTERIDGE, R.C. The perennial *Sesbania* species. In: GUTTERIDGE, R.C. & SHELTON, H.M. (Eds.) *Forage tree legumes in tropical agriculture*. Queensland: CAB International, 1994. p.49-64.
- GUTTERIDGE, R.C., SHELTON, H.M., ORAM, R.N. Register of Australian herbage plant cultivars. B. Legumes. 24. Sesban (A) *Sesbania sesban* (L.) Merrill (Sesban) Cv. Mount Cotton. *Aust. J. Exp. Agric.*, v.35, p.561, 1995.
- HENDERSHOT, L. C., & FORSAITH, J. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and non analgesics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.125, p.237-240, 1959.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Methods*, v.14, p.69-76, 1985.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.*, v.18, p.412, 1959.
- LOOMIS, T.A. *Fundamentos de toxicologia*. Zaragoza, Editorial Acribia, 1982. p.33.
- MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural products, screening and evaluation. In: WAGNER, H. & WOLF, P. *New natural products and plants drugs with pharmacological, biological or therapeutical activity*. Berlin, Springer-Verlag, 1977. p.23.
- NDOYE, I.; TOMEKPE, K.; DREYFUS, B.; D'OMMERGUES, Y.R. *Sesbania* and *Rhizobium* symbiosis: nodulation and nitrogen fixation. In: MACKLIN, B. & EVANS, D.O. (Eds.) *Perennial Sesbania Species In Agroforestry Systems*. Wamano: Nitrogen Fixing Tree Association, 1990. p.31-38.
- POTT, A. & POTT, V.J. *Plantas do Pantanal*. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal – Corumbá, Ms: Embrapa-Spi, 1994. p.179.
- POWELL, R.G.; SMITH JR., C.R.; WEISLEDER, D. Sesbanimide A and related tumor inhibitors from *Sesbania drummondii*: structure and chemistry. *Phytochemistry*, v.23, n.12, p.2789-2796, 1984.
- SCHIANTERELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. *Arzneim-Forsch. Drug. Res.*, v.32, n.3, p. 230-235, 1982.
- TAKAHASHI, R.N. & PAZ, M.M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. *Braz. J. Med. Res.*, v.20, p.607-610, 1987.
- THOMPSON, W.R. & WEIL, C.S. On the use of tables for moving average interpolation. *Biometrics*, v.8, p.51, 1952.
- TIOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation in the formalin test. *Pain*, v.51, p.5-17, 1992.
- TSUHAKO, M.H.; SANTOS, M.; HARAGUCHI, M.; NOBRE, D.; LEME, M.; MACRUZ, R. Presença de princípios ativos tóxicos nas sementes da leguminosa *Sesbania virgata* Arq. *Inst. Biol.*, São Paulo, v.56, n.1/2, p.27-29, 1989.
- TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; DELLA LOGGIA, R. The croton oil ear test revisited. *Agents Actions*, v. 17, n.3/4, p.347-349, 1985.
- VEASEY, E.A.; SCHAMMANS, E.A.; VENCOSKY, R.; MARTINS, P.S.; BANDEL, G. Morphological and agronomical characterization and estimates of genetic parameters of *Sesbania* Scop. (Leguminosae) accessions. *Genet. Mol. Biol.*, v.22, n.1, p.81-93, 1999.
- VINGER, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J. L.; JOHNSTON, P. R.; VENABLE, A. L.; MCKENZIE, R.K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the limb of rat. *Fed. Proc.*, v. 46, p.118-126, 1987.
- WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.111, p.544-547, 1962.
- YEH, S.Y. Potentiation of pentazocine antinociception by tripeleminamine in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 235, p.683-689, 1985.

Recebido em 29/8/02

Aceito em 7/11/02