

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

SAPONINAS DOS FRUTOS DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate):  
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA, ESTUDO FÍSICO-  
QUÍMICO E BIOLÓGICO

**MARIA PAULA GAROFO PEIXOTO**

PORTO ALEGRE, 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

SAPONINAS DOS FRUTOS DE *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate):  
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA, ESTUDOS FÍSICO-  
QUÍMICO E BIOLÓGICO

Tese apresentada por **Maria Paula Garfo Peixoto** para obtenção do GRAU DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. George González Ortega

Porto Alegre, 2009

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado – Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, perante a Comissão Examinadora constituída por:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clara Ismeria Damiani Bica  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marlise Araújo dos Santos  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Marcos Antonio Segatto Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina

P379s Peixoto, Maria Paula Garofo

Saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate): desenvolvimento de metodologia analítica, estudos físico-químico e biológico / Maria Paula Garofo Peixoto. Porto Alegre: UFRGS, 2009. – xx, 165 p. : il., gráf., tab.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Saponinas. 2. *Ilex paraguariensis*. 3. Erva-mate. I. González Ortega, George. II. Título.

CDU: 541.1:547.9

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

*Agradecimentos ao CNPq, à CAPES, órgãos que financiaram as bolsas de estudos para o desenvolvimento deste trabalho no Brasil e no exterior, respectivamente. Ao Laboratório de Desenvolvimento Galênico desta Faculdade, ao Laboratório de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor e ao Departamento de Farmácia do King`s College, University of London, que disponibilizaram todos os equipamentos e materiais necessários para elaboração desta tese.*

*Dedico este trabalho*  
*aos meus pais*  
*Maria Tereza e Paulo,*  
*Pelo amor e incentivo imensuráveis*

# *Agradecimentos*

Ao meu orientador Prof. Dr. George Ortega. Por ter carinhosamente me acolhido em seu grupo, pela confiança, pelo incentivo e pelas infindáveis discussões. Nossa convivência foi enriquecedora, agradável e proveitosa. Felizmente, pra mim, essa convivência se transformou em amizade. Muito muito obrigada por tudo. É imensurável o amadurecimento que tive em terras gaúchas e muito lhe devo por isso.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento Galênico: pelas lições de vida e por todo o aprendizado. Simone, Cabral, Greice, Samuel, Gustavo, Lísias, Angela, Bethânia, Francini, Romeu, Vinicius. Foi muito bom conviver com vocês. Em especial à Janine e Pedro pelo auxílio, descontração e amizade. A ajuda de vocês, sempre com um sorriso no rosto, foi imprescindível. Obrigada;

Ao Prof. Dr. Paulo Roehle e aos colegas do Instituto de Pesquisa Veterinária Desidério Finamor, pela convivência prazerosa e por todos os enriquecedores momentos de discussão. Foi muito bom conviver com vocês. Agradeço especialmente à Carine, Samuel e Ana Paula;

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Nádyá Pesce da Silveira, pela colaboração e discussões;

À Faculdade de Farmácia do King`s College London, pela acolhida calorosa. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cécile Dreiss, pela convivência enriquecedora e pelo exemplo de Pesquisadora que é;

Aos queridos colegas do 5º andar – King`s College. Vocês tornaram a minha permanência além-mar inesquecível. Abhinav, André, Franziska, Huying, Jay, Jamie, Nesrine. Obrigada por todo o carinho;

À minha companheira de casa, desafios e descobertas: Kelly, a convivência contigo foi muito importante. Obrigada amiga;

À torcida Ribeirãopretana. Meus eternos amigos: Maria Lúcia, Matheus e Karina. Aos eternos colegas de pós-graduação e amigos de sempre: Mônica, Alessandra, Camila, Cristiane e Guilherme.

A Ricardo pela trajetória de apoio e amizade contantes;

À Tia Albertina e Tio José, exemplos de vida;

À minha família em Porto Alegre: Lis, Kátia e Diego;

À Ervateira Barão de Cotegipe, pela doação sempre segura da matéria-prima vegetal.

## RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo a avaliação físico-química e biológica de uma fração de saponinas enriquecida, obtida a partir de frutos verdes de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (mate). A espécie apresenta grande importância econômica para vários países sul-americanos, dentre eles o Brasil. Os frutos verdes da espécie acumulam significativa quantidade de saponinas, entretanto, são considerados subproduto da indústria do beneficiamento das folhas de mate. O extrato liofilizado dos frutos (EX40) foi obtido por turboextração na proporção planta-solvente de 1:10 utilizando como solvente solução hidroalcoólica a 40%. Para análise do extrato bruto foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE-UV, que permitiu: 1) quantificar o marcador químico ilexosídeo II em EX40; 2) estimar o conteúdo em saponinas totais do extrato, tendo sido obtidos valores de 8,2 g% e 47,6 g% respectivamente. Uma fração enriquecida em saponinas, denominada MSF, foi obtida mediante fracionamento em fase sólida a partir de EX40, utilizando resina hidrofóbica poliaromática e gradiente metanol:água de polaridade decrescente. Os maiores teores de saponinas foram obtidos para as frações contendo 70 e 90 % de metanol. A reprodutibilidade do processo foi avaliada por CLAE-UV, considerando o desvio padrão relativo (DPR) entre a área dos dois picos majoritários de MSF produzidas em seis lotes distintos. Valores de DPR de 8,17% para o pico I (ilexosídeo II) e 5,96 % para o pico II (majoritário) foram obtidos. A toxicidade da fração foi avaliada pelo potencial hemolítico *in vitro* e citotoxicidade sobre cultura de células de mamífero (MDBK ATCC CCL-22). Para atividade hemolítica foi determinado um valor de IC<sub>50</sub> de 0,2 g/L (0,22 mM, expresso em ilexosídeo II). O valor de IC<sub>50</sub> para citotoxicidade foi 3,8 g/L (4,04 mM, expresso em ilexosídeo II), caracterizando um produto de baixa toxicidade. Dentre as várias atividades biológicas descritas para saponinas, selecionou-se avaliar MSF quanto ao seu potencial como imunoadjuvante, assim como a atividade tricomonocida. Para o primeiro caso, MSF foi testada em uma vacina contendo herpesvírus bovino tipo 5 como antígeno viral, nas doses de 100 e 500 µg. Entretanto, o incremento no título de IgG totais, avaliado por ELISA, não foi significativo. A atividade tricomonocida foi comparada aos tensoativos polissorbato 80 e tiloxapol e a uma fração enriquecida em saponinas de *Quillaja saponaria*. Após 24 h de incubação foi observado para MSF um efeito dose-dependente, atingindo letalidade total dos trofozoítos na concentração de 0,6 g/L. Esse efeito foi superior ao observado para polissorbato 80 e tiloxapol e similar ao de quillaia. O tratamento com metronidazol, administrado tanto após tratamento prévio dos trofozoítos com MSF quanto em associação com essa fração, não revelou qualquer alteração significativa no efeito de ambos os produtos, o que sugere ausência de interação entre MSF e MTZ e a possível existência de mecanismos de ação distintos. A caracterização físico-química enfatizou o estudo do tamanho e forma das micelas, seu comportamento reológico e capacidade de solubilizar compostos hidrofóbicos. A concentração micelar crítica foi determinada em 0,41 g/L utilizando um corante hidrofóbico como marcador. A análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e CRIO-MET revelou a presença simultânea de micelas alongadas, com tamanho superior a 500 nm, e micelas esféricas de tamanho menor. Para a fração de micelas esféricas, a análise por espalhamento de nêutrons a baixo ângulo permitiu estabelecer diâmetro de 17,9 Å, perfazendo 23,1 e

32,6 % das micelas observadas em soluções de MSF a 0,5 e 1,0 % m/v, respectivamente. O comportamento reológico de MSF nas concentrações de 0,25 a 4,0 %, determinado por reometria dinâmica com controle de deformação, foi do tipo viscoelástico para todas as concentrações. Esse fato corrobora a existência de agregados não-esféricos, filiformes, semelhantes a micelas tipo *wormlike*. A solubilização micelar de fármacos mediante MSF foi avaliada utilizando como substâncias-modelos os fármacos flurbiprofeno – FLB (ácido fraco) e carbamazepina - CBZ (base fraca), ambos pouco solúveis, e saponinas de quillaia como produto de comparação. Nas concentrações de 0,13 a 1,5 % as saponinas de quillaia foram mais eficientes frente ao flurbiprofeno, enquanto MSF foi capaz de aumentar significativamente a solubilidade da carbamazepina. O incremento na solubilização gerado por MSF foi de 0,0145 e 0,0129 g/L para CBZ e FLB, respectivamente.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis*, saponinas, micelas, CLAE-UV, MET, CRIO-MET, reologia dinâmica, solubilização micelar, citotoxicidade, tricomonas, imunoadjuvante.



## ABSTRACT

The present work aimed the physicochemical and biological evaluation of a saponin enriched fraction from the green fruits of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate), a species of great economical importance in several Southern American countries, including Brazil. Despite possessing high amounts of saponins, mate green fruits have no commercial use to date and are considered a waste product from the mate leaves processing companies. Mate fruits lyophilized extract (EX40) was produced using turbo-extraction having a 40:60 mixture of water and ethanol as solvent and a 1:10 drug/solvent proportion. An HPLC-UV method was developed and validated aiming at: I) Quantify the EX40 chemical marker, ilexoside II; II) Determine the EX40 total saponin content. The values obtained were of 8.20 wt% and 47.60 wt%, respectively. An enriched saponin fraction (MSF) was obtained from EX40 through a solid phase extraction process within a polyaromatic resin and a decreasing solvent polarity gradient of methanol and water. The higher recovery of mate saponins was achieved with the 70 and 90 % methanol-containing fractions. The process reproducibility was assessed by HPLC-UV through the analysis of the relative standard deviation (RSD) of the two major MSF saponins peak areas obtained in six different batches. RSD values of 8.17 % for peak I (ilexoside II) and 5.96 % for peak II (major peak) were obtained. The MSF toxicity was evaluated according to its haemolytical activity and *in vitro* cytotoxicity against a mammalian cell culture lineage (MDBK ATCC CCL-22). Values of  $IC_{50}$  of 0.2 g/L (0.22 mM expressed as ilexoside II) and 3.8 g/L (4.04 mM as Ilexoside II) were found for the haemolysis and cytotoxicity respectively. Therefore we could classify MSF as a low toxicity product. Among the several biological activities ascribed to saponins, this work focused on the investigation of MSF immune enhancer potential and its anti-trichomonads vaginalis activity. For the first evaluation, MSF was added to a bovine herpesvirus 5 vaccine, at 100 and 500  $\mu$ g doses. However total IgG titres determined by ELISA were not statistically significant. The anti-trichomonads activity of MSF was compared a saponin enriched fraction from the species *Quillaja saponaria* (Quillaja) and to tyloxapol and polysorbate 80. After 24h of incubation MSF presented a dose-dependent activity with total trophozoites lethality at a concentration of 0.6 g/L. The activity was higher than the synthetic surfactants and similar to Quillaja. The treatment with metronidazole (MTZ), performed in association and after exposing the trophozoites with MSF did not show any synergistic effect of MZT and MSF which suggest an absence of interaction between the compounds and also that they probably have distinct mechanisms of action. The physicochemical evaluation of MSF focused the determination of MSF micelles size and shape, their rheological behaviour and ability to increase the solubility of hydrophobic compounds. MSF critical micellar concentration was determined as 0.41 g/L using a hydrophobic dye as a probe. The transmission electron microscopy (TEM) and CRYO-TEM analysis revealed the occurrence of filiform micelles higher than 500 nm and smaller sizes spherical micelles simultaneously. The spherical micelles radius of 17.9 Å were determined using small angle neutron scattering and they corresponded to 23.1 and 32.6 % of the total micelles in MSF solutions of 0.5 and 1.0 % w/v, respectively. The rheological behavior of MSF ranging in concentration from 0.25 to 4.0% was determined on a dynamic strain control rheometer and a viscoelastic behavior was

observed for all concentrations. These findings corroborate the occurrence of non-spherical micelles very long in size (*wormlike*). MSF ability to improve the solubilisation of poor aqueous soluble drugs was assessed using carbamazepine (CBZ) and flurbiprofen (FLB) as a model of amphiphilic basic and acidic compounds. Saponin enriched fractions were evaluated in concentrations ranging from 0.13 to 1.5 %. Quillaja was more efficient toward the weak acid while MSF was able to increase significantly the CBZ solubility. The increase on CBZ and FLB solubility after MSF addition was of 0.0145 and 0.0129 g/L, respectively.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*, saponins, micelles, HPLC-UV, TEM, CRYO-TEM, dynamic rheology, micellar solubilisation, cytotoxicity, trichomonas, immunoadjuvant.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo da tese.....	5
Figura 1.1 – Saponinas isoladas dos frutos de mate.....	13
Figura 2.1 – LC-UV chromatograms of EX40 and MSF.....	49
Figura 2.2 – Structures and retention times of reference saponins .....	50
Figura 2.3 – Chromatogram of MSF after mass detection.....	52
Figura 2.4 – LC-UV and LC-MS chromatograms of ilexoside II.....	53
Figura 2.5 – Haemolytical activity of MSF and Quillaja saponins.....	54
Figura 3.1 – Chemical structure of ilexoside II.....	68
Figura 3.2 – Susceptibility of <i>Trichomonas vaginalis</i> to MSF.....	70
Figura 3.3 – Susceptibility of <i>Trichomonas vaginalis</i> to MSF/MTZ after pre-treatment and co-administration studies.....	72
Figura 3.4 – Comparative cytotoxicity of MSF and synthetic surfactants.....	72
Figura 4.1 – General structures of saponins from mate fruits.....	85
Figura 4.2 – Determination of CMC: Absorbance of MSF-PAN solutions.....	91
Figura 4.3 – TEM images of MSF at 0.6% (w/v).....	92
Figura 4.4 – CRYO-TEM images of MSF at 4.0% (w/v).....	93
Figura 4.5 – Small angle neutron scattering data: MSF at 0.5 and 1.0% (w/v)...	95
Figura 4.6 – Dynamic strain sweep measurements of MSF solutions.....	96
Figura 4.7 – Dynamic frequency sweep measurements of MSF solutions.....	97
Figura 4.8 – Micellar solubilisation of model drugs by MSF and Quillaja.....	99
Figura A1: Distribuição granulométrica da droga vegetal.....	125
Figura A2.1 – Perfil de tensão superficial de MSF.....	131
Figura A3.1 – Comparação das ondas de tensão e deformação e sinais de onda referência (0° e 90°).....	136
Figura A3.2 – Relação entre os vetores de tensão e deformação com os vetores de onda de referência.....	136
Figura A3.3 – Transformação do vetor de deformação em vetor referência e determinação de $\theta$ .....	137
Figura A.5.1 – Reverse phase LC-UV chromatograms of Ilexoside II at 0.5 mg/mL and MSF.....	151
Figura A5.2 – LC-UV chromatograms of alpha-hederin and quinovic derivatives fraction.....	152
Figura A.5.3 – Total IgG antibody using indirect ELISA.....	153
Figura A5.4 – IgG1 antibody titres using indirect ELISA.....	154
Figura A5.5 – IgG2A antibody titres using indirect ELISA.....	155

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Condições cromatográficas para quantificação de saponinas por CLAE-UV.....	20
Tabela 2.1 – Linear regression analysis, detection and quantification limits for ilexoside II and EX40.....	51
Tabela 3.1 – Susceptibility of <i>Trichomonas vaginalis</i> after exposure to MSF and reference substances.....	70
Tabela 4.1 – Conductivity and pH values for MSF and Quillaja.....	98
Tabela 4.2 – Linear regressions and determination coefficients for the solubilisation of model drugs by MSF and Quillaja.....	99
Tabela A2.1 – Pressão de superfície na CMC ( $\pi_{CMC}$ ), concentração superficial de excesso ( $\Gamma$ ) e área por molécula na interface ( $A$ ).....	132

## LISTA DE ABREVIATURAS

CMC	Critical Micellar Concentration Concentração Micelar Crítica
CRYO-TEM	Cryogenic Transmission Electron Microscopy Microscopia eletrônica de transmissão em condições criogênicas
EX40	Lyophilized total extract from mate fruits Extrato bruto liofizado obtido a partir dos frutos de mate
G'	Storage modulus Módulo elástico
G''	Loss modulus Módulo viscoso
MSF	Mate saponin enriched fraction Fração enriquecida em saponinas de mate
MTZ	Metronidazole Metronidazol
PAN	1-(2-pyridylazo)-2-naphthol 1-(2-piridilazo)-2-naftol
SANS	Small Angle Neutron Scattering Espalhamento de nêutrons a baixo ângulo
TEM	Transmission Electron Microscopy Microscopia eletrônica de transmissão

## SUMÁRIO

Introdução Geral.....	1
CAPÍTULO 1: Revisão da Literatura.....	9
1.1 <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil. e saponinas.....	11
1.2 Métodos de obtenção de frações saponosídicas.....	17
1.3 Métodos de quantificação de saponinas.....	19
1.4 Propriedades tensoativas e de micelização .....	20
1.5 Citotoxicidade.....	22
1.6 Atividades Biológicas.....	25
CAPÍTULO 2: Método analítico e obtenção da fração saponosídica.....	37
Introdução.....	39
PUBLICAÇÃO: Saponins from <i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.: LC-UV and and haemolytic activity.....	41
CAPÍTULO 3: Avaliação biológica.....	59
Introdução.....	61
PUBLICAÇÃO: Anti-trichomonas vaginalis activity of <i>Ilex paraguariensis</i> (mate) fruits.....	63
CAPÍTULO 4: Caracterização físico-química da fração de saponinas.....	77
Introdução.....	79
PUBLICAÇÃO: Micellar aggregates from <i>Ilex paraguariensis</i> fruits (mate)...	81
CAPÍTULO 5: Discussão Geral e Conclusão.....	107
ANEXO I Caracterização da droga vegetal e obtenção da solução extrativa.....	121
ANEXO II Perfil de tensão superficial da fração enriquecida em saponinas.....	129
ANEXO III Determinação dos módulos viscoso e elástico por reologia dinâmica.....	133
ANEXO IV Parecer do Comitê de ética em Pesquisa.....	139
ANEXO V Artigo: avaliação da atividade imunoadjuvante da fração saponosídica de mate.....	143
Biografia.....	162

# *INTRODUÇÃO*

---

Saponinas são substâncias anfífilas constituídas por um núcleo hidrofóbico, triterpênico ou esteróide, ligado a uma ou mais cadeias de açúcares e apresentam diversas atividades biológicas e usos tecnológicos (Francis *et al.*, 2002).

A principal fonte de obtenção destes compostos são espécies vegetais superiores, dentre as quais se destacam *Panax ginseng*, *Gypsophila sp* e *Bupleurum falcatum*, as quais ocorrem na Ásia e Europa e, em especial, *Quillaja saponaria*, espécie encontrada no continente sul-americano (Peru, Chile e Bolívia). Contudo, nenhuma destas possui ocorrência natural no Brasil (Francis *et al.*, 2002; Pavei, 2004).

*Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate) é uma espécie amplamente cultivada na região sul do Brasil e que se caracteriza pelo elevado teor de saponinas em suas folhas e, principalmente, nos frutos verdes (Kraemer, 1997; Athayde *et al.*, 2000; Taketa *et al.*, 2004b; Pavei *et al.*, 2007).

No Brasil, a erva-mate é reconhecidamente um dos principais produtos dentre a produção vegetal e silvicultura, com produção estimada em cerca de 230 mil toneladas em 2002 (IBGE, 2003).

Todo esse montante está relacionado estritamente ao comércio das folhas, sendo os frutos subproduto do processamento da erva-mate e, portanto, desprovidos de valor comercial. Considerando o maior acúmulo de saponinas no fruto em relação aos outros órgãos, estes constituem uma fonte de matéria-prima abundante e ainda não explorada para obtenção de saponinas (Alves *et al.*, 2001; Heinrichs; Malavolta, 2001).

Uma consulta aos principais escritórios de patentes (*US Patent Office, World Intellectual Property Organization, European Patent Office, IK Patent Office, Japanese Patent Office*) gerou cerca de 10.000 resultados para a palavra-chave saponinas. Nesses, incluem-se aspectos que abrangem desde a obtenção de frações enriquecidas até uma vasta gama de aplicações, com destaque para o uso de saponinas como imunoadjuvante na formulação de vacinas. Outras aplicações incluem atividades biológicas como antiviral, anticâncer e antiprotozoários. Também são citadas aplicações tecnológicas como agente promotor de absorção, agente espumante, agente



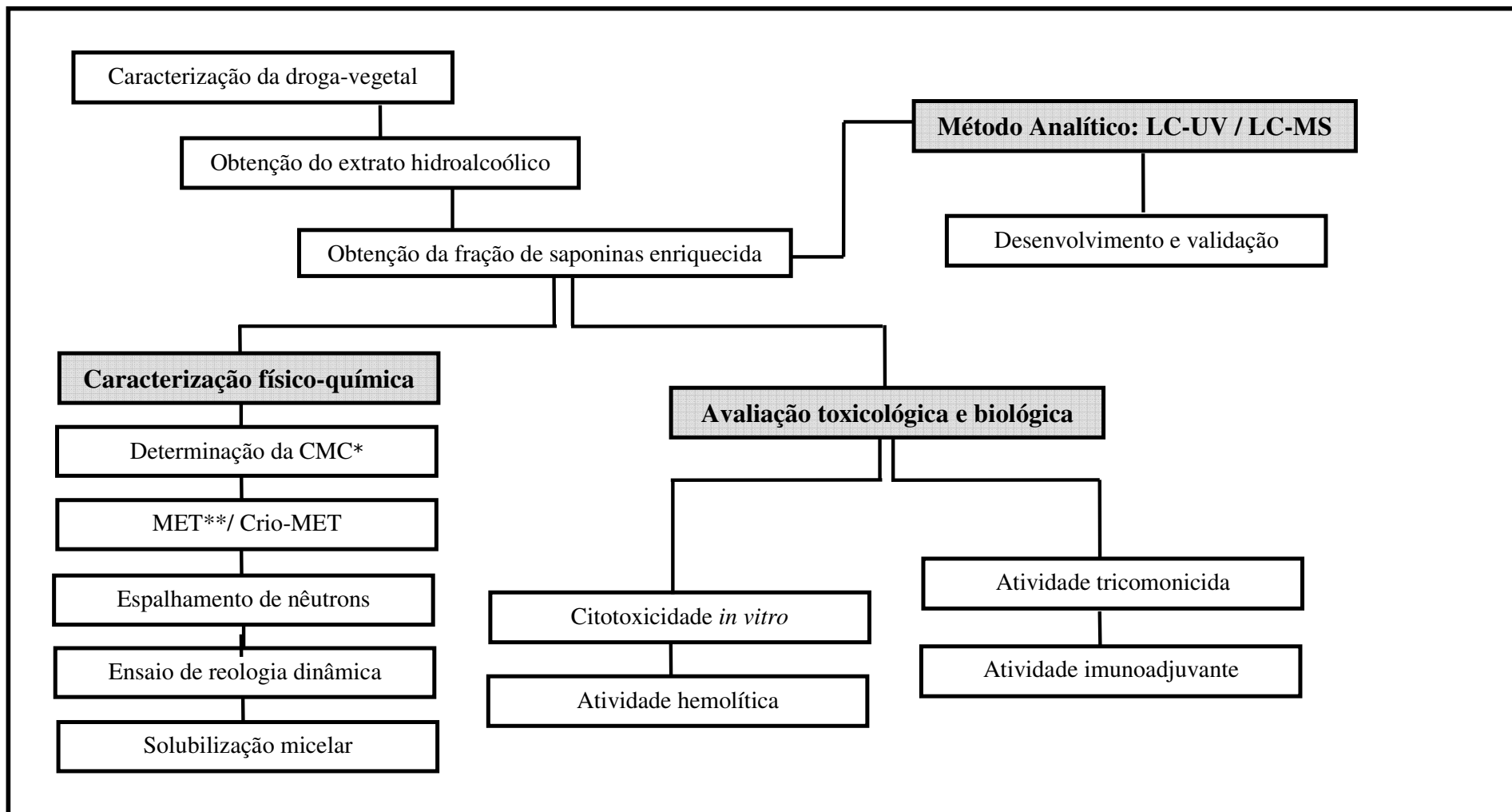
emulsificante e detergente. *Quillaja saponaria* e *Panax ginseng* são as principais espécies encontradas nas citações (Base de dados Scopus, consulta em 12/11/2009). Uma consulta à mesma base de dados com o termo *Ilex paraguariensis* resulta em 130 patentes. Entretanto, quando cruzados os termos *Ilex paraguariensis* e saponinas, este número se reduz a 10, sendo que nenhuma explicita alguma aplicação tecnológica ou biológica direta.

Dessa maneira, constata-se um amplo espaço para investigações no tocante às saponinas de mate, tanto do ponto de vista acadêmico tanto com vistas ao desenvolvimento de produtos. Nesse contexto este trabalho teve por objetivo geral a avaliação de propriedades físico-químicas e biológicas de uma fração de saponinas enriquecida, obtida a partir dos frutos verdes de mate, visando fornecer subsídios para sua utilização. Para tal, foram realizadas as seguintes etapas:

- Desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV utilizando Ilexosídeo II como marcador químico para a quantificação de saponinas totais e monitoramento do processo de fracionamento e purificação;
- Adaptação e avaliação da reprodutibilidade do processo de fracionamento de saponinas de *Ilex paraguariensis* desenvolvido por Pavei (2004);
- Avaliação da citotoxicidade *in vitro* da fração saponosídica sobre linhagem de células de mamíferos;
- Avaliação do perfil hemolítico *in vitro*;
- Avaliação da atividade tricomonocida *in vitro*;
- Avaliação do potencial como imunoadjuvante em vacinas utilizando modelo *in vivo*;
- Estudo físico-químico da fração saponosídica com ênfase nas estruturas micelares e na capacidade de solubilização micelar de compostos hidrofóbicos;

As etapas do trabalho são ilustradas no esquema a seguir.

Figura 1. Esquema representativo da tese



\* Concentração micelar crítica

\*\*Microscopia eletrônica de transmissão

Para fins de sua apresentação, o trabalho foi dividido em cinco capítulos, sendo eles:

- I. Revisão da literatura;
- II. Desenvolvimento de metodologia analítica, obtenção da fração saponosídica e avaliação da atividade hemolítica;
- III. Avaliação da atividade tricomonocida e citotoxicidade sobre linhagem de células de mamíferos;
- IV. Caracterização físico-química das micelas;
- V. Discussão Geral e Conclusão

ANEXOS:

- I. Caracterização da droga vegetal e obtenção da solução extrativa
- II. Perfil de tensão superficial da fração saponosídica
- III. Determinação dos módulos viscoso e elástico a partir do ensaio de reologia dinâmica
- IV. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa
- V. Artigo: Avaliação da atividade imunoaddjuvante

## Referências

Alves, L. F. A.; Santana, D. L. Q.; Brancalhão, R. M. C. Ocorrência de *Perigonias lusca* (Fabr.) em erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no Brasil. **Neotropical Entomology**, v.30, p.339-340, 2001.

Athayde, M. L.; Coelho, G. C.; Schenkel, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v.55, n.7, p.853-857, 2000.

Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H. P. S.; Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: A review. **British Journal of Nutrition**, v.88, n.6, p.587-605, 2002.

Heinrichs, R.; Malavolta, E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Ciência Rural**, v.31, p.781-785, 2001.

IBGE. Produção em Comunicação Social: Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE**, v.27 de novembro, 2003.

Kraemer, K. H. ***Ilex paraguariensis* St-Hil (erva-mate): distribuição de saponinas e estudos iniciais em culturas de células em suspensão** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997. 169 p. Tese (Doutorado em Farmácia).

Pavei, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. 134 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

Pavei, C.; Guzzato, P.; Ros Petrovick, P.; Gosmann, G.; González-Ortega, G. Development and validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (mate) fruits. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v.30, n.1, p.87-95, 2007.

*CAPÍTULO 1*

*REVISÃO DA LITERATURA*

---

## 1. REVISÃO DA LITERATURA

### 1.1 *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. e saponinas

As saponinas constituem uma classe química bastante heterogênea, cujo nome deriva de sua propriedade de formação de espuma em solução aquosa (Milgate; Roberts, 1995). Estão amplamente distribuídas em diversas espécies vegetais abrangendo aproximadamente 100 famílias (Oleszek, 2002) e alguns gêneros de esponjas marinhas. Quimicamente são constituídas por uma porção hidrofóbica triterpênica ou esteróide ligada a uma ou mais cadeias de açúcares, em geral, glicose, galactose, ácido glicurônico, xilose ou metilpentose (Francis *et al.*, 2002) cuja massa molecular pode variar entre 600 e 2000 Da, aproximadamente (Oleszek, 2002; Schenkel *et al.*, 2003).

As saponinas mais comumente encontradas na natureza são as triterpênicas com agliconas de 30 átomos de carbono. No caso das saponinas triterpênicas, mais de 50% apresentam o núcleo hidrofóbico do tipo oleano (Hiller, 1987).

Além da classificação relacionada ao núcleo fundamental triterpênico ou esteróide, as saponinas podem ser subdivididas em função do número de cadeias de açúcares ligados. Aquelas que apresentam uma única cadeia de açúcar ligado à aglicona, em geral via ligação éter na posição C3, são denominadas monodesmosídicas. Quando apresentam duas ou três cadeias de açúcares são classificadas como bidesmosídicas ou tridesmosídicas, respectivamente (Hiller, 1987; Schenkel *et al.*, 2003).

*Ilex paraguariensis*, popularmente conhecida como mate, é uma espécie endêmica em alguns países sul-americanos para a qual é relatado um significativo teor de saponinas (Cardoso; George-Kraemer, 2008). A Argentina é atualmente o principal produtor mundial seguida pelo Brasil e Paraguai. A produção mundial estimada no ano de 2002 foi de cerca de 900.000 toneladas abrangendo uma área próxima a 3000 quilômetros quadrados (Heck; Mejia, 2007).

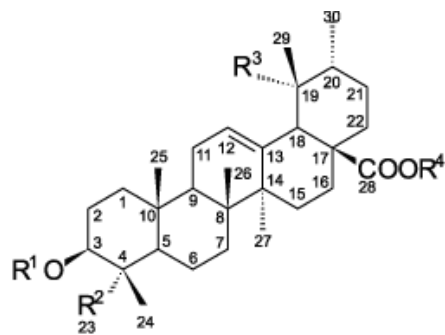
No caso específico do Brasil, o cultivo de mate envolve cerca de 180.000 propriedades rurais. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, em 1998, a produção brasileira foi de 325 mil toneladas de erva, estando concentrada nos Estados do Paraná (49,4%) seguido de Rio Grande do Sul (28,1%), Santa Catarina (21,4%) e Mato Grosso do Sul com 1,1% da produção. Além do grande número de agricultores, cerca de 750 empresas estão envolvidas no processamento da erva-mate (Medrado, 2005).

Os constituintes químicos que ao longo da história do consumo e pesquisa de mate têm despertado maior interesse são os polifenóis e metilxantinas (Schubert *et al.*, 2006; Gnoatto *et al.*, 2007; Heck; Mejia, 2007).

Os estudos fitoquímicos com as saponinas de *Ilex paraguariensis* no País se iniciaram no PPGCF-UFRGS no final da década de 80, sendo os frutos apenas mais recentemente avaliados como uma matéria-prima de interesse (Gosmann *et al.*, 1989; Kraemer, 1997; Athayde *et al.*, 2000).

O primeiro relato da ocorrência de saponinas e a constatação de um maior acúmulo nos frutos verdes deram-se com o trabalho de Kraemer (1997). Este dado foi posteriormente confirmado por Athayde (2000) e Pavei (2004).

No tocante à química de saponinas encontradas na folhas de mate, há relatos da presença concomitante de saponinas mono e bidesmosídicas, derivadas principalmente dos ácidos ursólico e oleanólico (Gnoatto *et al.*, 2005). No caso dos frutos, foram identificadas algumas sapogeninas e saponinas distintas daquelas encontradas nas folhas (Figura 1). As saponinas encontradas nos frutos apresentam em adição aos núcleos acima citados, os derivados dos ácidos rotúndico e pomólico (Taketa *et al.*, 2004a). Matessaponinas 2, 3, J1, J3, J4, descritas para as folhas, não foram encontradas nos frutos (Pavei *et al.*, 2007).



	<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>
<b>1</b>	$\alpha$ -L-Ara1 $\rightarrow$	CH <sub>2</sub> OH	HO	H
<b>2</b>	$\alpha$ -L-Ara1 $\rightarrow$	CH <sub>3</sub>	HO	$\beta$ -D-Glc1 $\rightarrow$
<b>3</b>	$\beta$ -D-Glc1 $\rightarrow$ 3 $\alpha$ -L-Ara1 $\rightarrow$	CH <sub>3</sub>	HO	$\beta$ -D-Glc1 $\rightarrow$

Figura 1. Saponinas isoladas dos frutos de *Ilex paraguariensis*. Fonte: (Taketa *et al.*, 2004a), com modificações.

O quadro a seguir ilustra alguns dos principais trabalhos sobre mate realizados no período de 1989 a 2007.



Quadro 1. Trabalhos acerca da espécie *Ilex paraguariensis* realizados no PGGCF-UFRGS

AGRONÔMICO/QUÍMICO	BIO/TOXICOLÓGICO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Identificação das <u>matesaponinas</u> 1 a 4 <b>Folhas</b> (A)</li> <li>• Identificação das <u>saponinas</u> J1, J2, J3a, J3b, J4 <b>Folhas</b> (B)</li> <li>• Identificação da <u>saponina</u> G5 (C) <b>Folhas</b></li> <li>• Variação intra e inter-populacional de metilxantinas e <u>saponinas</u> <b>Folhas</b> (D)</li> <li>• Variação dos teores de metilxantinas sob diferentes formas de cultivo e variação intra-populacional do perfil de <u>saponinas</u> <b>Folhas</b> (E)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Atividade anti-edematogênica (+), antialgica (+), antibacteriana (-) e antifúngica (-) de <u>saponinas</u> de mate <b>Folhas</b> (B)</li> <li>• Atividade antioxidante de extratos de mate <b>Folhas</b> (J)</li> <li>• Avaliação da produção de <u>saponinas</u> em culturas de células (C)</li> <li>• Avaliação da irritação dérmica de fração de <u>saponinas</u> enriquecida <b>Frutos</b> (I)</li> </ul>
ANALÍTICO	TECNOLÓGICO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Quantificação de <u>saponinas</u> (agliconas) via hidrólise <b>Folhas</b> (G)</li> <li>• Quantificação de <u>saponinas</u> polares <b>Frutos</b> (H)</li> <li>• Quantificação da fração de polifenóis de mate <b>Folhas</b> (J)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Influência do método de secagem da erva sobre teor de polifenóis e metilxantinas (F) <b>Folhas</b></li> <li>• Secagem de extratos por nebulização (F e G) <b>Folhas</b></li> <li>• Comparação da distribuição de <u>saponinas</u> em frutos verdes e maduros, raízes, ramos e folhas (C)</li> <li>• Influência do método de extração sobre o perfil de metilxantinas <b>Folhas</b> (G)</li> <li>• Método de fracionamento de <u>saponinas</u> <b>Frutos</b> (H)</li> <li>• Potencial espumógeno de <u>saponinas</u>, caracterização físico-química <b>Frutos</b> (I)</li> </ul>

**Autores:** A: (Gosmann, 1989); B: (Montanha, 1990); C: (Kraemer, 1997); D: (Athayde *et al.*, 2000); E: (Coelho, 2002); F: (Campos, 1996); G: (Gnoatto, 2002); H: (Pavei, 2004); I: (Canto, 2007); J: (Silva, 2007).

Nota-se, portanto, o desenvolvimento de estudos nas diversas áreas necessárias à caracterização e desenvolvimento de aplicações para matérias-primas vegetais, os quais, no entanto, estão concentrados nas folhas de mate.

Especificamente no Laboratório de Desenvolvimento Galênico desta Faculdade foram realizados os trabalhos pioneiros direcionados à obtenção de uma fração enriquecida em saponinas a partir dos frutos verdes. O método de fracionamento foi originalmente desenvolvido por Pavei (2004) mediante aplicação de extração em fase sólida, sendo submetido à patente no ano seguinte (INPI 0501510-3 de 12/02/2006). Neste mesmo trabalho foram desenvolvidos métodos para quantificação das saponinas por CLAE-UV, tendo como enfoque as saponinas mais polares de mate.

Em um trabalho posterior, Canto (2007) avaliou a potencialidade desta fração como adjuvante espumógeno, tendo obtido resultados bastante significativos quando comparados aos tensoativos sintéticos. Adicionalmente foi avaliado o potencial de irritação cutânea utilizando coelhos como modelo, não tendo sido detectada irritação significativa. Tal observação torna esta fração um objeto de estudo ainda mais interessante quanto comparada a frações de saponinas obtidas de outras espécies vegetais, frequentemente hemolíticas e irritantes (Francis *et al.*, 2002). Na tentativa de entender fenômenos relativos à formação e estabilidade da espuma, nesse trabalho deu-se início à avaliação físico-química das micelas formadas, tendo sido detectados valores de tamanho de micelas significativamente superiores aos já relatados na literatura para saponinas. Este dado, particularmente, instigou-nos no sentido de iniciar uma melhor caracterização destas micelas e do comportamento físico-químico das saponinas de mate.

## **1.2 Métodos de obtenção de frações enriquecidas em saponinas**

A obtenção de frações enriquecidas a partir de plantas medicinais tem se tornado uma estratégia interessante e de certa forma uma nova maneira de olhar para os produtos provenientes de plantas, em função de algumas vantagens interessantes, tanto sob o ponto de vista químico como biológico. Dentre elas tem-se o aumento da

concentração da classe de interesse com a conseqüente retirada de interferentes e compostos de atividade antagônica, maior constância biológica, facilidade de monitoramento químico e, conseqüentemente, um maior valor agregado.

O fracionamento líquido-líquido é um das técnicas mais empregadas para a obtenção de saponinas isoladas ou mesmo sob a forma de misturas. O processo consiste em extrações subseqüentes mediante uso de solventes apolares, como éter ou hexano, seguidas de partição com *n*-butanol/água (Soetan *et al.*, 2006; Güçlü-Ustundag; Mazza, 2007). No entanto, esta técnica apresenta como desvantagens a potencial perda de compostos mais polares e, ainda, a possibilidade da permanência residual de solventes na fração de saponinas. Embora o fracionamento em fase líquida ainda seja aplicado no isolamento visando a identificação de saponinas, ou para posterior avaliação biológica (Atta Ur *et al.*, 2008a; Atta Ur *et al.*, 2008b; Dini *et al.*, 2009), outras técnicas apresentam-se viáveis, dentre elas, a utilização de cromatografia líquida preparativa e o fracionamento em fase sólida.

Muitos dos trabalhos em pequena escala aplicam a extração em fase sólida visando diminuir o número de compostos interferentes na quantificação analítica, utilizado cartuchos preenchidos com resina (Nord; Kenne, 1999; Theunis *et al.*, 2007; Lin; Yang, 2008). Outros trabalhos fazem uso de colunas abertas, visando obter maiores quantidades de material. Nesse caso, vários tipos de resina têm sido propostas, dentre elas sílica gel, sílica C18 e resinas poliaromáticas. Resinas poliaromáticas macroporosas como Diaion HP-20, D101 ou equivalentes são empregadas em diversos trabalhos, sendo compostas por copolímeros de poliestireno e divinilbenzeno, utilizando como solvente de eluição gradientes decrescentes de polaridade compostos por água e metanol/etanol (Park *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2008). Esta última estratégia foi empregada no presente trabalho.

### 1.3 Métodos de quantificação de saponinas

A análise quali e quantitativa de saponinas teve início com métodos gravimétricos, biológicos e espectrofotométricos, chegando aos métodos cromatográficos, dentre os quais se incluem CCD e CLAE acoplada a diversos tipos de detectores, como UV, arranjo de diodos, espectrômetro de massa e detector por espalhamento de luz evaporativo. Dentre eles, CLAE é o método mais aplicado à detecção de saponinas e agliconas (Oleszek, 2002). A ausência de grupos cromóforos com absorção acima de 205-210 nm tem levado a um incremento na utilização dos detectores de massa e, mais recentemente, do detector por espalhamento de luz. Entretanto, a detecção em UV continua sendo factível e amplamente utilizada na rotina analítica em função da maior disponibilidade de equipamentos (Hubert *et al.*, 2005). A tabela 1 exemplifica condições empregadas na detecção de saponinas por CLAE acoplada ao detector UV.

Os trabalhos demonstram grande variabilidade tanto no tipo de coluna como nas fases móveis selecionadas, que vão desde pH ácido, mediante uso de ácido fórmico e ácido trifluoroacético, até o uso de tampões para condições de pH mais elevados. O tempo de corrida também é bastante variável, incluindo valores de 30 a 85 minutos.

No tocante à avaliação de saponinas de *Ilex paraguariensis* por CLAE, existem dois trabalhos já publicados, ambos empregando detecção em UV. O primeiro deles foi desenvolvido para extratos das folhas, mediante hidrólise, utilizando ácido oleanólico como padrão (Gnoatto *et al.*, 2005). Para os frutos, foi desenvolvido e validado um método com eluição isocrática tendo como padrão a matesaponina 3 (Pavei *et al.*, 2007). O segundo método teve enfoque nas saponinas mais polares de mate, o que pode ter levado a uma subestimação do teor de saponinas totais nos frutos.

Tabela 1- Exemplo de condições cromatográficas empregadas na quantificação de saponinas por CLAE-UV.

<b>Autores</b>	<b>Espécie</b>	<b>Condições cromatográficas</b>
Theunis (2007)	<i>Maesa lanceolata</i>	Coluna: C18 (250 × 3,2 mm, 5 µm); detecção em 210 nm, fluxo 0,5 mL/min; volume de injeção 20 µL, Eluição em gradiente - Ácido fórmico 0,05%; acetonitrila/ácido fórmico 0,05%, Tempo de corrida: 55 min.
Jin (2007)	<i>Radix Astragali</i>	Coluna: Fenil-hexila: (150 mm x 4,6 mm, 5 µm,), Temperatura: 30 °C, detecção em 230 nm, fluxo 1,0 mL/min, Eluição em gradiente – água; acetonitrila/água 80:20, Tempo de corrida: 35 min.
Li (2005)	<i>Panax notoginseng</i>	Coluna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm,), detecção em 203 nm, fluxo 0,8 mL/min, volume de injeção: 5 µL, Eluição em gradiente – acetonitrila; ácido Fórmico 0,001%, Tempo de corrida: 30 min.
Hubert (2005)	<i>Glycine max</i>	Coluna: C18 (250 mm× 4.6 mm, 5 µm), Temperatura 30 °C, detecção em 205 nm, fluxo: 1 ml/min,volume de injeção: 50µL Eluição em gradiente – ácido trifluoroacético 0,05%, acetonitrila, Tempo de corrida 40 min.
Zhu (2004)	<i>Panax spp</i>	Coluna: ODS-AQ303 (250 mm× 4,6 mm, 5 µm), Temperatura: 40 °C, detecção em 196 nm, fluxo: 1mL/min, Eluição em gradiente: Tampão fosfato de potássio 10 mM; acetonitrila, Tempo de corrida: 85 min.

#### 1.4 Propriedades tensoativas e micelização

O termo tensoativo é empregado para substâncias que apresentam atividade de superfície, ou seja, que são capazes de interferir nas interfaces sólido-líquido, sólido-gás e líquido-gás (Zhang; Somasundaran, 2006a; Zhang; Somasundaran, 2006b).

A adsorção de tensoativos nas interfaces modifica drasticamente propriedades como hidrofobia, carga de superfície e propriedades diretamente relacionadas a floculação/dispersão, flotação, molhabilidade, emulsificação, entre outras. Os

tensoativos possuem também a tendência de formar agregados micelares, quando acima da concentração micelar crítica (CMC).

As saponinas de *Ilex paraguariensis* são tipicamente anfifílicas e possuem como porção hidrofóbica núcleos triterpênicos como porção hidrofóbica, que são mais rígidos e volumosos quando comparados aos tensoativos convencionais dotados de cadeias alquílicas. As cadeias rígidas apresentam comportamento diferenciado quanto à natureza de suas interações, tamanho, forma e estrutura dos agregados micelares (Mitra; Dungan, 2000). Dessa forma, muitas das informações disponíveis sobre a formação de micelas de tensoativos convencionais não podem ser diretamente extrapoladas para estes tipos de compostos (Mitra; Dungan, 2000), sendo necessários estudos físico-químicos para cada tipo de saponina ou fração enriquecida. A maior parte dos estudos físico-químicos relatados se concentram nas saponinas de *Quillaja saponaria*, sendo descritos dados de concentração micelar crítica, tamanho das micelas e variação de ambas propriedades em função de modificações no meio, como variação de pH, adição de eletrólitos e temperatura. Para quillaia, foram observada micelas de cerca de 3 nanômetros de raio e valores de CMC variando entre 0,51 e 0,72 g/L (Mitra; Dungan, 1997). Variações na estrutura, micelar, a exemplo da formação de micelas alongadas (wormlike) só foram observadas após adição de outros elementos como colesterol e fosfolipídeos (Demana *et al.*, 2005; Myschik *et al.*, 2006; Pham *et al.*, 2006). Para os demais trabalhos, que contemplam saponinas de *Panax notoginseng*, *Glycine max*, *Sapindus mukorossi* e *Gleditsia sinensis*, apenas foram encontrados dados a respeito dos valores de CMC e, em poucos casos, de tamanho micelar (Wang *et al.*, 2005; Balakrishnan *et al.*, 2006; Decroos *et al.*, 2006; Xiong *et al.*, 2008).

Xiong e col. (2008) avaliaram a influência da concentração de uma mistura de saponinas obtidas de *Panax notoginseng* sobre o tamanho das micelas formadas, utilizando espalhamento de luz. As micelas sofreram um incremento linear em seu tamanho, variando de 11 a 40 nm na faixa de 120 a 600 g/L. O valor de CMC da mistura foi determinado em 0,339 g/L.

Já Decroos e col. (2006) avaliaram individualmente saponinas isoladas de soja e seus valores de CMC. O enfoque no isolamento das saponinas foi justificado pela grande variabilidade de sua composição química, que inclui além de saponinas mono e bidesmosídicas, a possibilidade de acetilação e da ocorrência de um grupamento 2,3-diidro-2,5-diidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (DDMP) conjugado, os quais conferem maior hidrofobia às mesmas. Os valores de CMC variaram entre 0,56 e 3,2 g/L. Foram observados ainda, menores valores de CMC para as saponinas monodesmosídicas em relação as bidesmosídicas.

Para uma mistura de saponinas de *Sapindus mukorossi*, o valor de CMC de 0,45 g/L foi determinado por condutivimetria, sendo o tamanho micelar independente da concentração (Balakrishnan *et al.*, 2006).

Para a mistura de saponinas de mate, Canto (2007) determinou por espalhamento de luz dinâmico um valor de diâmetro efetivo em torno de 170 nm, para a faixa de 0,3 a 12,5 g/L, sem uma alteração significativa em função da concentração. Embora sejam escassos os dados na literatura, este valor é bastante superior aos já relatados.

## 1.5 Citotoxicidade

Por serem moléculas anfifílicas, os tensoativos são capazes de interagir em maior ou menor grau com membranas biológicas, determinando assim várias das atividades biológicas que lhes são atribuídas, entre elas, citotoxicidade e hemólise.

Grande parte dos estudos sobre citotoxicidade de saponinas tem utilizado linhagens tumorais, visando o tratamento de vários tipos de câncer (Xiao *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Niu *et al.*, 2008). Um menor número de trabalhos enfoca a citotoxicidade como um efeito indesejável sobre as células do hospedeiro, quando da utilização de saponinas frente a microorganismos ou ainda como adjuvantes em formulações (Maes *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2008). O mecanismo responsável por essas atividades tem sido associado à interação das saponinas com esteróis da membrana celular, em especial o colesterol (Cheeke, 2000; Ikbal *et al.*, 2007),

provocando citotoxicidade inespecífica, via necrose celular (Mimaki *et al.*, 2001). Também há relatos acerca da interferência das saponinas sobre as proteínas transmembrânicas e do citoesqueleto celular (Chwalek *et al.*, 2006) e, ainda, via mecanismos apoptóticos (Hsu *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2005), o que denota a complexidade dessas interações.

Os estudos para estabelecer relações estrutura-atividade têm sido limitados pela dificuldade de isolar ou sintetizar compostos análogos em quantidade necessária e pela ampla diversidade estrutural desta classe de substâncias (Williams; Gong, 2007).

Kuljanabhagavad e col. (2008) avaliaram a citotoxicidade de saponinas triterpênicas obtidas de diferentes partes da espécie *Chenopodium quinoa* Willd e observaram uma maior atividade para as saponinas monodesmosídicas, onde a presença de ácido carboxílico em C-28 mostrou ter importância significativa. As saponinas bidesmosídicas apresentaram citotoxicidade moderada ou nula, exceto quando determinados grupos funcionais estão ligados à aglicona, como acila e aldeído. Nesse sentido, o padrão de fatores estruturais determinantes da citotoxicidade guarda certa analogia com aqueles observados para a atividade hemolítica (Oda *et al.*, 2000; Voutquenne *et al.*, 2002).

Para a atividade hemolítica, dentre as saponinas triterpênicas, as monodesmosídicas têm se mostrado mais ativas que as bidesmosídicas (Oda e col., 2000). Contudo há exceções notáveis à regra. Algumas saponinas derivadas da hederagenina e os sojassapogenóis, embora monodesmosídicas, apresentam atividade hemolítica virtualmente nula. Analisando a relação estrutura-atividade de 59 saponinas triterpênicas com diferentes agliconas, Voutquenne e col. (2002) determinaram que para as saponinas monodesmosídicas, substituições na aglicona contribuem fortemente para atividade. Para as saponinas bidesmosídicas, ramificações na cadeia de açúcar, assim como um balanço de polaridade das duas cadeias de açúcares parecem ser significativos.



Chwalek (2006) analisaram a relação das atividades hemolítica e citotóxica de saponinas derivadas do núcleo hederagenina sem chegar a evidenciar uma correlação definida.

As saponinas isoladas de folhas e frutos de *Ilex paraguariensis* (mate) são majoritariamente derivados triterpênicos dos ácidos ursólico e oleanólico, na maioria bidesmosídicas (Gosmann *et al.*, 1989; Taketa *et al.*, 2004b) Nos frutos foram identificadas as saponinas bidesmosídicas ilexosídeo II e ziyu-glicosídeo I e a saponina monodesmosídica matesídeo.

Existem poucos trabalhos relativos à avaliação da toxicidade de mate. Provavelmente, o motivo disso esteja associado ao consumo difundido e tradicional de bebidas preparadas a partir desta espécie, mas que não reflete necessariamente a forma de utilização e as concentrações, por exemplo, em formulações cosméticas e farmacêuticas.

Os trabalhos de avaliação de toxicidade relatados concentram-se na avaliação de efeitos mutagênicos/genotóxicos. Leitão e Braga (1994) detectaram a ocorrência de atividade mutagênica no teste de AMES, sobre células bacterianas e atividade genotóxica de extratos obtidos a partir das folhas. Outro trabalho avaliou a ocorrência de efeitos mutagênicos, genotóxicos e clastogênicos sobre bactérias, culturas de linfócitos e células de mamíferos, de uma infusão de folhas de mate, representando o consumo usual pela população. Os resultados demonstraram efeitos genotóxicos sobre bactérias, alterações cromossomais em linfócitos e ausência de clastogenicidade *in vivo* (Fonseca *et al.*, 2000). Alves e col. (2008) determinaram a ausência de efeitos aneugênicos e clastogênicos sobre culturas de células de linfócitos.

No teste de Draize para potencial irritação tópica, uma fração de saponinas enriquecida não mostrou efeito significativo (Canto, 2007).

Não foram localizados trabalhos relacionados à avaliação da citotoxicidade *in vitro* utilizando cultura de células para *Ilex paraguariensis*. No tocante à atividade hemolítica, existe apenas um trabalho que relata a ausência de efeito hemolítico para

uma fração de saponinas obtida a partir das folhas, mediante emprego de metodologia clássica de fracionamento (Gosmann *et al.*, 1989). Não foram encontrados relatos acerca da atividade hemolítica de saponinas dos frutos de mate.

Adicionalmente, alguns dos estudos realizados focam a relação entre as atividades hemolítica e imunoadjuvante (Kenji *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002; Voutquenne *et al.*, 2002; Oda *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2006).

### **1.6 Atividades biológicas**

Embora o papel fisiológico das saponinas nos vegetais não esteja completamente elucidado, as mesmas são consideradas como parte integrante de seu sistema de defesa. Diversos trabalhos têm constatado seus efeitos sobre células animais, fúngicas e bacterianas (Francis *et al.*, 2002).

Um amplo número de propriedades biológicas tem sido atribuído a esta classe de substâncias em virtude de sua natureza anfifílica, suas propriedades de complexação com esteróides, proteínas e fosfolípídeos, além das propriedades de formação de poros em membranas celulares. Dentre elas se destacam a atividade hemolítica, ictiotóxica, molusquicida, anti-helmíntica, hipocolesterolêmica, antiviral entre outras (Francis *et al.*, 2002; Schenkel *et al.*, 2003).

Provavelmente, o maior número de trabalhos no tocante à atividade biológica de saponinas esteja relacionado ao desenvolvimento de vacinas, tendo essas como adjuvantes. Os trabalhos iniciais foram desenvolvidos com as saponinas de *Quillaja saponaria*, sob a forma de misturas, saponinas isoladas ou de complexos imunoestimulantes (Sjölander; Cox, 1998; Petrovsky; Aguilar, 2004). Recentemente, diversas outras espécies com padrões estruturais distintos das saponinas de quillaia, a exemplo das saponinas de soja, ginseng e polígala também apresentaram resultados bastante satisfatórios (Cox; Coulter, 1999; Mimaki *et al.*, 2001; Katselis *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2008).

No tocante à *Ilex paraguariensis*, grande parte dos trabalhos relatados são relativos à avaliação biológica de extratos obtidos a partir das folhas, tendo como enfoque principal a atividade antioxidante (Gugliucci, 1996; Filip *et al.*, 2000; Schinella *et al.*, 2000; Bastos *et al.*, 2006; Da Silva *et al.*, 2008; Arçari *et al.*, 2009; Matsumoto *et al.*, 2009; Sugimoto *et al.*, 2009). Outros relatos de atividade incluem redução de inflamação aguda após exposição à fumaça de cigarro (Lanzetti *et al.*, 2008), efeito positivo anti-obesidade (Rossmann, 2005; Pang *et al.*, 2008; Arçari *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2009); vaso-relaxação e redução de colesterol e triglicérides, diminuição da progressão da aterosclerose durante dieta hipercolesterolêmica (Stein *et al.*, 2005; Pamplona Mosimann *et al.*, 2006), prevenção de hidrólise de nucleotídeos associados ao desenvolvimento de doenças circulatórias (Görger *et al.*, 2005), atividade antiviral *in vitro* (Müller *et al.*, 2007) e atividade anti-bacteriana, especificamente contra *Propionibacterium acnes* (Tsai *et al.*, 2009).

Em relação aos frutos de mate, o único relato de avaliação de atividade biológica foi feito por Schubert e col. (2007), no qual foi avaliada a atividade antioxidante de extratos de diferentes polaridades obtidos a partir dos frutos verdes e a atividade antimicrobiana de frações de saponinas enriquecidas. A atividade antioxidante dos frutos foi inferior em relação às folhas, não sendo observada, ainda atividade frente a fungos e bactérias modelo.

## Referências

- Alves, R. J. V.; Jotz, G. P.; Do Amaral, V. S.; Montes, T. M. H.; Menezes, H. S.; De Andrade, H. H. R. The evaluation of mate: (*Ilex paraguariensis*) genetic toxicity in human lymphocytes by the cytokinesis-block in the micronucleus assay. **Toxicology in Vitro**, v.22, n.3, p.695-698, 2008.
- Arçari, D. P.; Bartchewsky, W.; Dos Santos, T. W.; Oliveira, K. A.; Funck, A.; Pedrazzoli, J.; De Souza, M. F. F.; Saad, M. J.; Bastos, D. H. M.; Gambero, A.; Carvalho, P. D. O.; Ribeiro, M. L. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced Obese Mice. **Obesity**, 2009.
- Athayde, M. L. **Metilxantinas e saponinas em quatro populações de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: triterpenos e saponinas em outras espécies do gênero *Ilex*** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. 232 p. Tese (Doutorado em Farmácia).
- Athayde, M. L.; Coelho, G. C.; Schenkel, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v.55, n.7, p.853-857, 2000.
- Atta Ur, R.; Zareen, S.; Choudhary, M. I.; Akhtar, M. N.; Khan, S. N. alpha-glucosidase inhibitory activity of triterpenoids from *Cichorium intybus*. **Journal of Natural Products**, v.71, n.5, p.910-913, 2008a.
- Atta Ur, R.; Zareen, S.; Choudhary, M. I.; Akhtar, M. N.; Ngounou, F. N. A triterpenoidal saponin and sphingolipids from *Pteleopsis hyloidendron*. **Phytochemistry**, v.69, n.12, p.2400-2405, 2008b.
- Balakrishnan, S.; Varughese, S.; Deshpande, A. P. Micellar characterisation of saponin from *Sapindus mukorossi*. **Tenside, Surfactants, Detergents**, v.43, n.5, p.262-268, 2006.
- Bastos, D. H. M.; Fornari, A. C.; Queiroz, Y. S.; Torres, E. A. F. S. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.3, p.399-404, 2006.
- Campos, A. M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hil. aquifoliaceae (erva-mate)** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996. 149 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
- Canto, G. S. **Avaliação físico-química e tecnológica da fração saponosídica dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. : potencialidade como adjuvante espumógeno.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. 215 p. Tese (Doutorado em Farmácia).

Cardoso, A. C.; George-Kraemer, J. E. Variabilidade genética em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hilaire) em populações naturais da região noroeste do Rio Grande do Sul. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador, Bahia. **Anais do 54º Congresso Brasileiro de Genética**, 2008.

Cheeke, P. R. Actual and potential applications of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* saponins in human and animal nutrition. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1-10, 2000.

Choi, Y. H.; Sertic, S.; Kim, H. K.; Wilson, E. G.; Michopoulos, F.; Lefeber, A. W. M.; Erkelens, C.; Kricun, S. D. P.; Verpoorte, R. Classification of *Ilex* species based on metabolomic fingerprinting using nuclear magnetic resonance and multivariate data analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.4, p.1237-1245, 2005.

Chwalek, M.; Lalun, N.; Bobichon, H.; Ple, K.; Voutquenne-Nazabadioko, L. Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides: Haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v.1760, n.9, p.1418-1427, 2006.

Coelho, G. C. **Teores de metilxantinas e saponinas e morfologia foliar de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sob a influência de diferentes fatores ambientais e em diferentes variedades e populações** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. 229 p. Tese (Doutorado em Farmácia).

Cox, J.; Coulter, A. Prospects for the development of new vaccine adjuvants. **BioDrugs**, v.12, n.6, p.439-453, 1999.

Da Silva, E. L.; Neiva, T. J. C.; Shirai, M.; Terao, J.; Abdalla, D. S. P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v.41, n.10, p.973-979, 2008.

Decroos, K.; Vincken, J. P.; Van Koningsveld, G. A.; Gruppen, H.; Verstraete, W. Preparative chromatographic purification and surfactant properties of individual soyasaponins from soy hypocotyls. **Food Chemistry**, v.101, n.1, p.324-333, 2006.

Demana, P. H.; Davies, N. M.; Hook, S.; Rades, T. Quil A-lipid powder formulations releasing ISCOMs and related colloidal structures upon hydration. **Journal of Controlled Release**, v.103, n.1, p.45-59, 2005.

Dini, I.; Tenore, G. C.; Dini, A. Saponins in *Ipomoea batatas* tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v.113, n.2, p.411-419, 2009.

Filip, R.; Lotito, S. B.; Ferraro, G.; Fraga, C. G. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v.20, n.10, p.1437-1446, 2000.

Fonseca, C. A. S.; Otto, S. S.; Paumgartten, F. J. R.; Leitão, A. C. Nontoxic, mutagenic, and clastogenic activities of mate-chimarrão (*Ilex paraguariensis*). **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.19, n.4, p.333-346, 2000.

Francis, G.; Kerem, Z.; Makkar, H. P. S.; Becker, K. The biological action of saponins in animal systems: A review. **British Journal of Nutrition**, v.88, n.6, p.587-605, 2002.

Gnoatto, S. C. B. **Metodologias analíticas para quantificação de marcadores químicos em preparações de *Ilex paraguariensis* (A. St. Hil.) e desenvolvimento de extrato seco por nebulização** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. 122 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

Gnoatto, S. C. B.; Bassani, V. L.; Coelho, G. C.; Schenkel, E. P. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate **Química Nova**, v.30, n.2, p.304-307, 2007.

Gnoatto, S. C. B.; Schenkel, E. P.; Bassani, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.16, n.4, p.723-726, 2005.

Görgen, M.; Turatti, K.; Medeiros, A. R.; Buffon, A.; Bonan, C. D.; Sarkis, J. J. F.; Pereira, G. S. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* decreases nucleotide hydrolysis in rat blood serum. **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, n.1, p.73-77, 2005.

Gosmann, G. **Saponinas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (erva-mate)** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1989. 108 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

Gosmann, G.; Schenkel, E. P.; Seligmann, O. A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v.52, n.6, p.1367-1370, 1989.

Güçlü-Ustundag, O.; Mazza, G. Saponins: Properties, applications and processing. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.47, n.3, p.231-258, 2007.

Gugliucci, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.224, n.2, p.338-344, 1996.

Heck, C. I.; Mejia, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v.72, n.9, p.138-151, 2007.

Hiller, K. New results on the structure and biological activity of triterpenoid saponins. In: Hostettmann, K. (Org.). **Biologically active natural products**. Oxford: Clarendon Press, 1987. p.167-184.

Hsu, M. J.; Cheng, J. S.; Huang, H. C. Effect of saikosaponin, a triterpene saponin, on apoptosis in lymphocytes: Association with c-myc, p53, and bcl-2 mRNA. **British Journal of Pharmacology**, v.131, n.7, p.1285-1293, 2000.

Hubert, J.; Berger, M.; Dayde, J. Use of a simplified HPLC - UV analysis for soyasaponin B determination: Study of saponin and isoflavone variability in soybean cultivars and soy-based health food products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.10, p.3923-3930, 2005.

Ikbal, C.; Mounir, T.; Mounia, B. H. K.; Habib, B. H. M. Histological effects of *Cestrum parqui* saponins on *Schistocerca gregaria* and *Spodoptera littoralis*. **Journal of Biological Sciences**, v.7, n.1, p.95-101, 2007.

Jin, H. K.; Park, S. Y.; Hyun, K. L.; Ah, Y. P.; Ju, S. K.; Sam, S. K.; Youm, J. R.; Sang, B. H. Quantitative evaluation of *Radix astragali* through the simultaneous determination of bioactive isoflavonoids and saponins by HPLC/UV and LC-ESI-MS/MS. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v.28, n.7, p.1187-1194, 2007.

Katselis, G. S.; Estrada, A.; Gorecki, D. K. J.; Barl, B. Adjuvant activities of saponins from the root of *Polygala senega* L. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.85, n.11, p.1184-1194, 2007.

Kenji, O.; Matsuda, H.; Murakami, T.; Katayama, S.; Ohgitani, T.; Yoshikawa, M. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. **Biological Chemistry**, v.381, n.1, p.67-74, 2000.

Kim, J. Y.; Park, K. W.; Moon, K. D.; Lee, M. K.; Choi, J.; Yee, S. T.; Shim, K. H.; Seo, K. I. Induction of apoptosis in HT-29 colon cancer cells by crude saponin from Platycodi Radix. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.12, p.3753-3758, 2008.

Kraemer, K. H. **Ilex paraguariensis St-Hil (erva-mate): distribuição de saponinas e estudos iniciais em culturas de células em suspensão**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997. 169 p. Tese (Doutorado em Farmácia).

Kuljanabhadgavad, T.; Thongphasuk, P.; Chamulitrat, W.; Wink, M. Triterpene saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. **Phytochemistry**, v.69, n.9, p.1919-1926, 2008.

Lanzetti, M.; Bezerra, F. S.; Romana-Souza, B.; Brando-Lima, A. C.; Koatz, V. L. G.; Porto, L. C.; Valenca, S. S. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition**, v.24, n.4, p.375-381, 2008.

Leitão, A. C.; Braga, R. S. Mutagenic and genotoxic effects of mate (*Ilex paraguariensis*) in prokaryotic organisms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.27, n.7, p.1517-1525, 1994.

Li, L.; Zhang, J. L.; Sheng, Y. X.; Guo, D. A.; Wang, Q.; Guo, H. Z. Simultaneous quantification of six major active saponins of *Panax notoginseng* by high-performance liquid chromatography-UV method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.38, n.1, p.45-51, 2005.

Lin, J. T.; Yang, D. J. Determination of steroidal saponins in different organs of yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). **Food Chemistry**, v.108, n.3, p.1068-1074, 2008.

Liu, G.; Anderson, C.; Scaltreto, H.; Barbon, J.; Kensil, C. R. QS-21 structure/function studies: Effect of acylation on adjuvant activity. **Vaccine**, v.20, n.21-22, p.2808-2815, 2002.

Maes, L.; Vanden Berghe, D.; Germonprez, N.; Quirijnen, L.; Cos, P.; De Kimpe, N.; Van Puyvelde, L. In Vitro and In Vivo Activities of a Triterpenoid Saponin Extract (PX-6518) from the Plant *Maesa balansae* against Visceral Leishmania Species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.1, p.130-136, 2004.

Martins, F.; Noso, T. M.; Porto, V. B.; Curiel, A.; Gambero, A.; Bastos, D. H. M.; Ribeiro, M. L.; Carvalho, P. D. O. Maté tea inhibits in vitro pancreatic lipase activity and has hypolipidemic effect on high-fat diet-induced obese mice. **Obesity**, 2009.

Matsumoto, R. L. T.; Bastos, D. H. M.; Mendonça, S.; Nunes, V. S.; Bartchewsky, W.; Ribeiro Jr, M. L.; Carvalho, P. D. O. Effects of Maté tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.5, p.1775-1780, 2009.

Medrado, M. J. S. Sistemas de Produção: cultivo da erva-mate. Embrapa Florestas. Versão Eletrônica, 2005. Disponível em <[http:// sistemas deproducao . cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/ Cultivo da ErvaMate / index.htm](http://sistemas.deproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva-mate/Cultivo da ErvaMate/index.htm)>. Acesso em: 10/08/2009.

Milgate, J.; Roberts, D. C. K. The nutritional and biological significance of saponins. **Nutrition Research**, v.15, n.8, p.1223-1249, 1995.



Mimaki, Y.; Yokosuka, A.; Kuroda, M.; Sashida, Y. Cytotoxic activities and structure-cytotoxic relationships of steroidal saponins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.24, n.11, p.1286-1289, 2001.

Mitra, S.; Dungan, S. R. Micellar Properties of Quillaja Saponin. 1. Effects of Temperature, Salt, and pH on Solution Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, n.5, p.1587-1595, 1997.

\_\_\_\_\_. Micellar properties of quillaja saponin. 2. Effect of solubilized cholesterol on solution properties. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.17, n.2, p.117-133, 2000.

Montanha, J. A. **Estudo químico e biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Aquifoliaceae)**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande Sul, 1990. 92 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

Müller, V.; Chavez, J. H.; Reginatto, F. H.; Zucolotto, S. M.; Niero, R.; Navarro, D.; Yunes, R. A.; Schenkel, E. P.; Barardi, C. R. M.; Zanetti, C. R.; Simões, C. M. O. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. **Phytotherapy Research**, v.21, n.10, p.970-974, 2007.

Myschik, J.; Lendemans, D. G.; Mcburney, W. T.; Demana, P. H.; Hook, S.; Rades, T. On the preparation, microscopic investigation and application of ISCOMs. **Micron**, v.37, n.8, p.724-734, 2006.

Niu, Y. P.; Wu, L. M.; Jiang, Y. L.; Wang, W. X.; Li, L. D.  $\beta$ -Escin, a natural triterpenoid saponin from Chinese horse chestnut seeds, depresses HL-60 human leukaemia cell proliferation and induces apoptosis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.60, n.9, p.1213-1220, 2008.

Nord, L. I.; Kenne, L. Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from *Quillaja saponaria* Molina. **Carbohydrate Research**, v.320, n.1-2, p.70-81, 1999.

Oda, K.; Matsuda, H.; Murakami, T.; Katayama, S.; Ohgitani, T.; Yoshikawa, M. Adjuvant and Haemolytic Activities of 47 Saponins Derived from Medicinal and Food Plants. **Biological Chemistry**, v.381, n.1, p.67-74, 2000.

\_\_\_\_\_. Relationship between adjuvant activity and amphipathic structure of soyasaponins. **Vaccine**, v.21, n.17-18, p.2154-2160, 2003.

Oleszek, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, v.967, n.1, p.147-162, 2002.

Pamplona Mosimann, A. L.; Wilhelm-Filho, D.; Da Silva, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, v.26, n.1, p.59-70, 2006.

Pang, J.; Choi, Y.; Park, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.476, n.2, p.178-185, 2008.

Park, S. Y.; Choi, H. S.; Yook, C. S.; Nohara, T. A new lupane glycoside from the leaves of *Acanthopanax koreanum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.53, n.1, p.97-99, 2005.

Pavei, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. 134 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

Pavei, C.; Guzatto, P.; Ros Petrovick, P.; Gosmann, G.; González-Ortega, G. Development and validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (mate) fruits. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v.30, n.1, p.87-95, 2007.

Petrovsky, N.; Aguilar, J. C. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. **Immunology and Cell Biology**, v.82, n.5, p.488-496, 2004.

Pham, H. L.; Shaw, P. N.; Davies, N. M. Preparation of immuno-stimulating complexes (ISCOMs) by ether injection. **International Journal of Pharmaceutics**, v.310, n.1-2, p.196-202, 2006.

Rossmann, J. Influencing obesity positively by an expert and modern health management. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v.16, n.5, p.XVII-XIX, 2005.

Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Athayde, M. L. Saponinas. In: Simões, C. M. D. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P. D.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. p.711-740.

Schinella, G. R.; Troiani, G.; Dávila, V.; De Buschiazzi, P. M.; Tournier, H. A. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.269, n.2, p.357-360, 2000.

Schubert, A.; Pereira, D. F.; Zanin, F. F.; Alves, S. H.; Beck, R. C. R.; Athayde, M. L. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Pharmazie**, v.62, n.11, p.876-880, 2007.

Schubert, A.; Zanin, F. F.; Pereira, D. F.; Athayde, M. L. Variação anual de metilxantinas totais em amostras de *Ilex paraguariensis* A. St. - Hil. (Ervamate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1233-1236, 2006.

Silva, F. A. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.-aquifoliaceae (erva-mate)**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. 212 p. Tese (Doutorado em Farmácia).

Sjölander, A.; Cox, J. C. Uptake and adjuvant activity of orally delivered saponin and ISCOM(TM) vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.34, n.2-3, p.321-338, 1998.

Soetan, K. O.; Oyekunle, M. A.; Aiyelaagbe, O. O.; Fafunso, M. A. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum Bicolor* L. Moench. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.23, p.2405-2407, 2006.

Stein, F. L. P.; Schmidt, B.; Furlong, E. B.; Soares, L. A. S.; Soares, M. C. F.; Vaz, M. R. C.; Baisch, A. L. M. Vascular responses to extractable fractions of *Ilex paraguariensis* in rats fed standard and high-cholesterol diets. **Biological Research for Nursing**, v.7, n.2, p.146-156, 2005.

Sugimoto, S.; Nakamura, S.; Yamamoto, S.; Yamashita, C.; Oda, Y.; Matsuda, H.; Yoshikawa, M. Brazilian natural medicines. IIII structures of triterpene oligoglycosides and lipase inhibitors from mate, leaves of *Ilex paraguariensis*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.57, n.3, p.257-261, 2009.

Sun, H. X.; Chen, Y.; Ye, Y. Ginsenoside Re and notoginsenoside R1: Immunologic adjuvants with low haemolytic effect. **Chemistry and Biodiversity**, v.3, n.7, p.718-726, 2006.

Sun, Y.; Tong, H.; Li, M.; Li, Y.; Guan, S.; Liu, J. Immunological adjuvant effect of Japanese ginseng saponins (JGS) on specific antibody and cellular response to ovalbumin and its haemolytic activities. **Vaccine**, v.26, n.47, p.5911-5917, 2008.

Taketa, A. T. C.; Breitmaier, E.; Schenkel, E. P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Mate). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, n.2, p.205-211, 2004a.

Taketa, A. T. C.; Gnoatto, S. C. B.; Gosmann, G.; Pires, V. S.; Schenkel, E. P.; Guillaume, D. Triterpenoids from Brazilian *Ilex* species and their in vitro antitrypanosomal activity. **Journal of Natural Products**, v.67, n.10, p.1697-1700, 2004b.

Theunis, M. H. B. L.; Foubert, K.; Pollier, J.; Gonzalez-Guzman, M.; Goossens, A.; Vlietinck, A. J.; Pieters, L. A. C.; Apers, S. Determination of saponins in *Maesa lanceolata* by LC-UV: Development and validation. **Phytochemistry**, v.68, n.22-24, p.2825-2830, 2007.

Tiwari, P.; Singh, D.; Singh, M. M. Anti- *Trichomonas* activity of *Sapindus* saponins, a candidate for development as microbicidal contraceptive. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, n.3, p.526-534, 2008.

Tsai, T. H.; Wu, W. H.; Tseng, J. T. P.; Tsai, P. J. In vitro antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against *Propionibacterium acnes*. **Food Chemistry**, 2009.

Voutquenne, L.; Lavaud, C.; Massiot, G.; Le Men-Olivier, L. Structure-activity relationships of haemolytic saponins. **Pharmaceutical Biology**, v.40, n.4, p.253-262, 2002.

Wang, Z. W.; Gu, M. Y.; Li, G. Z. Surface properties of *Gleditsia* saponin and synergisms of its binary system. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.26, n.3, p.341-347, 2005.

Williams, J. R.; Gong, H. Biological activities and syntheses of steroidal saponins: The shark-repelling pavoninins. **Lipids**, v.42, n.1, p.77-86, 2007.

Xiao, J. X.; Huang, G. Q.; Zhu, C. P.; Ren, D. D.; Zhang, S. H. Morphological study on apoptosis Hela cells induced by soyasaponins. **Toxicology in Vitro**, v.21, n.5, p.820-826, 2007.

Xiong, J.; Guo, J.; Huang, L.; Meng, B.; Ping, Q. Self-micelle formation and the incorporation of lipid in the formulation affect the intestinal absorption of *Panax notoginseng*. **International Journal of Pharmaceutics**, v.360, n.1-2, p.191-196, 2008.

Zhang, L.; Somasundaran, P. Adsorption of mixtures of nonionic sugar-based surfactants with other surfactants at solid/liquid interfaces. I. Adsorption of n-dodecyl- $\beta$ -d-maltoside with anionic sodium dodecyl sulfate on alumina. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.302, n.1, p.20-24, 2006a.

Zhang, R.; Somasundaran, P. Advances in adsorption of surfactants and their mixtures at solid/solution interfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.123-126, n.SPEC. ISS., p.213-229, 2006b.

Zhu, S.; Zou, K.; Cai, S.; Meselhy, M. R.; Komatsu, K. Simultaneous determination of triterpene saponins in ginseng drugs by high-performance liquid chromatography. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.52, n.8, p.995-998, 2004.

## *CAPÍTULO 2*

# *MÉTODO ANALÍTICO e OBTENÇÃO DA FRAÇÃO SAPONOSÍDICA*

---

## **Introdução**

Considerando o alto teor de saponinas presente nos frutos verdes de mate e a ausência de um método analítico capaz de detectar saponinas com uma ampla faixa de polaridade, neste capítulo é apresentado o desenvolvimento e validação de um método por CLAE-UV. Ilexosídeo II foi selecionado como marcador químico e sua ocorrência no extrato bruto liofilizado foi demonstrada mediante uso de CLAE acoplada a detector de massa (EM e EM/EM). O conteúdo de saponinas totais no extrato foi também estimado.

A partir do extrato bruto foi obtida uma fração de saponinas enriquecida (MSF) mediante extração em fase sólida, a qual constituiu a matéria-prima analisada nos demais capítulos. A reprodutibilidade do método de obtenção da fração foi avaliada por CLAE-UV.

MSF foi adicionalmente avaliada quanto ao seu potencial hemolítico, o qual representa uma das limitações à utilização de saponinas na área farmacêutica.

Os dados são apresentados na forma de artigo, submetido ao periódico *Die Pharmazie*.

Saponins from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate) fruits: LC-UV assay and haemolytic activity

Maria Paula Garofo Peixoto<sup>a</sup>; Janine Treter<sup>a</sup>; Cabral Pavei<sup>a</sup>; Gustavo Luís Borré<sup>a</sup>; Simone Gasparin Verza<sup>a</sup>; Samuel Cibulski<sup>b</sup>; Paulo Michel Roehe<sup>b</sup>; Grace Gosmann<sup>a</sup>; Cécile Ayako Dreiss<sup>c</sup>; George González Ortega<sup>a\*</sup>.

**Affiliation**

<sup>a</sup> *Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, Brazil, Phone number (+55-51-33085278), Fax number (+55-51-3308-5437).*

<sup>b</sup> *Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Fepagro Saúde Animal, Estrada Municipal do Conde, 6000, 92990-000, Eldorado do Sul, Brazil.*

<sup>c</sup> *Pharmaceutical Science Division, King's College London, Franklin-Wilkins Building, 150 Stamford Street, London SE1 9NH, United Kingdom.*

\* **Corresponding author:** [ortega@farmacia.ufrgs.br](mailto:ortega@farmacia.ufrgs.br); phone number: +55-51-3308-5278; fax number: +55-51-3308-5437.

## **Abstract**

An LC-UV method was developed and validated to quantify the ilexoside II, one of the major saponins occurring in unripe fruits of *Ilex paraguariensis* (mate) and to estimate fruits total saponin content. From the green fruits, a saponin enriched fraction (MSF) was produced by solid phase extraction with high yields and good reproducibility. All MSF peaks detected by LC-MS spectrometry showed molecular weights within the range of saponins. Ilexoside II and total saponin content on mate lyophilized extract were 8.20 % (w/w) and 47.60 % (w/w) respectively. The MSF showed low *in vitro* toxicity against red blood cells, affording favourable evidence toward its potential use for biological and technological purposes.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*; saponins; method validation; mass spectrometry, haemolytic activity; *Aquifoliaceae*



## 1. Introduction

*Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae) known as mate is widely recognized in several South American countries due to the use of its leaves in the production of stimulant tea-like beverages. The worldwide production of mate was estimated at around 900,000 tons/year with Argentina, Paraguay and Brazil being the main producers (Heck; Mejia, 2007). Due to its importance and increased consumption, the species has recently been the subject of a review on its chemical and technological properties (Heck; Mejia, 2007). However, the fruits are considered a waste product of mate leaves industrial processing and currently have no application (Schubert *et al.*, 2007).

Besides methylxanthines, caffeoil-derivatives and other polyphenolics, high saponin contents were reported in both mate leaves and green fruits (Schenkel *et al.*, 1997; Pavei, 2004; Taketa *et al.*, 2004). Specifically, lower amounts of methylxanthines and polyphenols and a higher accumulation of saponins were found in the green fruits, making them a valuable and abundant source of saponins (Pavei *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 2007).

Although some relevant biological properties have been previously ascribed to mate extracts such as antiviral, anti-inflammatory, antiglycation as well as anti-atherosclerosis activity (Gugliucci; Stahl, 1995; Lunceford; Gugliucci, 2005; Pamplona Mosimann *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2007), most studies were mainly focused on non-purified products derived from leaves. Instead, very little attention has been devoted to the purification and biological evaluation of mate saponins either from leaves or fruits (Montanha, 1990; Schubert *et al.*, 2007).

Saponins possess a number of interesting biological activities and industrial applications (Hiller, 1987; Milgate; Roberts, 1995; Güçlü-Ustundag; Mazza, 2007; Heck; Mejia, 2007). In the pharmaceuticals area in particular, saponins have been proposed as absorption enhancers, foaming agent, emulsifiers, immunoadjuvants and immunostimulants, (Pillion *et al.*, 1995; Benichou *et al.*, 1999; Güçlü-Ustundag; Mazza, 2007; Guy, 2007). However the process of obtaining isolated pure compounds

generally is expensive, time-consuming, and leads to relative low yields. Conversely, polymer solid phase extraction/purification is one of the strategies used to eliminate low molecular weight compounds and obtain saponin fractions having different polarity either aiming for analytical studies or biological evaluation (Nord; Kenne, 1999; Park *et al.*, 2005; Khanna; Kannabiran, 2008; Liu *et al.*, 2008; Dini *et al.*, 2009). As slight changes of chemical composition can lead to different responses in terms of biological and toxicological features, the saponin mixture must be carefully monitored and standardized. Analytically, saponins assay represents a hard task due the absence of chromophore groups with absorption above 210-215 nm. Evaporative light scattering and mass spectrometry are examples of feasible methods used for saponin detection (Park *et al.*, 1996; Young; Dolan, 2004; Yoo *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2008), nevertheless the wider access to LC-UV probably makes a more sensible and accessible approach for quality control and routine measurements.

In order to provide a background for the biological and technological applications of mate green fruits, this study reports the development of a quantitative method to quantify fruits total saponin content as well as ilexoside II. Ilexoside II, a bidesmosidic saponin previously identified on mate fruits (Taketa *et al.*, 2004), was selected as the chemical marker of the lyophilized extract. Additionally, a saponin-enriched fraction was extracted from mate fruits and its chemical fingerprint assessed by LC-MS. Considering that one of the main drawbacks of *in vivo* application of saponins is its high toxicity, especially to red blood cells (Qin *et al.*, 2006; Gauthier *et al.*, 2009), the haemolytic activity of the mate saponin fraction was also evaluated.

## **2. Experimental**

### **2.1 Plant material**

Mate green fruits harvested from a selected cultivar in January 2008 were kindly supplied by Ervateira Barão (Barão de Cotegipe, RS, Brazil). A voucher specimen was identified for Dr. Lílian Auler Mentz from Federal University of Rio Grande do Sul and deposited at the Herbarium under the code ICN 125105 (Porto Alegre, Brazil).

### **2.2 Chemicals and solvents**

Acetonitrile LC-grade was purchased from Tedia (Brazil) and formic acid p.a. from Vetec (Brazil). Ultrapure water (Milli-Q<sup>®</sup> system, Millipore, USA) was used throughout the work. The saponins E7, E8, matesaponin-4, breviscuspisaponin-1, ilexoside II and pedunculoside previously isolated and purified from *Ilex* species. Quillaja saponin proceeded from Sigma (USA).

### **2.3 Plant extract and saponin fraction**

Mate green fruits were manually selected, air-dried at 35°C during 72 h in a forced ventilation oven (Memmert, Germany) and grounded in a cutter mill (Retsch SK1, Germany). A 100 g- sample of middle coarse powder (2.1 µm) was first extracted by static maceration during 40 min with 1 L of a 40% hydroethanolic solution and subsequently submitted to vortical extraction (Ultra-turrax T25 Basic, IKA, Germany) at 11000 rpm, during 15 min, avoiding overheating. The extractive solution was centrifuged at 2.01 g for 20 min (T32 A, Janetzki, Germany), filtered, concentrated at 55 ± 3°C under reduced pressure up to one-half of its original volume (Buchi R-114, Switzerland) and freeze-dried (Modulyo 4L, Edwards, USA). The freeze dried extracts were coded as EX40.

The mate saponin fraction (MSF) was obtained from EX40 by solid phase extraction (SPE) within a Diaion HP-20 polyaromatic resin and a decreasing polarity gradient using methanol:water mixtures. Saponins were recovered from the less polar fractions containing methanol 70 and 90% (v/v). The process yield was determined by considering the weight of lyophilized extract initially introduced into the column and the amount recovered after the separation process. Reproducibility of the process was assessed on six different batches monitoring the relative standard deviation (RSD) of the two major saponin peak areas by LC-UV analysis.

## **2.4 LC-UV analysis**

LC-UV analysis was performed in a Shimadzu LC-10AD Class equipment (Kyoto, Japan), provided with a CBM-10A system controller, a SIL-10A automatic injector (20  $\mu$ L-loop) and an UV detector SPD-20AV. A Phenomenex C18 column (USA), with 250 x 4.6 mm i.d., was thermostated to  $40 \pm 1$  °C (Cromacon, Brazil). The flow rate was set at 1.0 mL/min and wavelength detection at 205 nm. Elution was performed following a nine-step gradient procedure with formic acid 0.01% (v/v; pH 3.2) as the mobile phase A and acetonitrile:formic acid (0.99:0.01, v/v) as the mobile phase B, as follows: 0–3.0 min, 29–30% B; 3.01–4.0 min, 30% B; 4.01–8.0 min, 30–33% B; 8.01–12.0 min, 33% B; 12.01–23.0 min, 33–47% B; 23.01–30.0 min, 47% B; 30.01–42.0, 47–29 %B; 42.01–45.0 min, 29%B.

### **2.4.1 Method validation**

By analysing saponins obtained from some other *Ilex* species possessing different substitutions patterns, a wide polarity range LC-UV method was developed in order to assure the detection of both mono and bidesmosidic saponins occurring on mate lyophilized extract. Method validation was conducted according to the ICH (2005). Ilexoside II, a bidesmosidic saponin previous isolated and reported in mate

saponin fruits (Taketa *et al.*, 2004) was selected as the EX40 chemical marker. Standard purity was assessed by LC-MS analysis. Briefly:

For the standard curve, ilexoside II was dissolved in acetonitrile:water (1:1) to achieve concentrations of 0.024, 0.048, 0.072, 0.096, and 0.12 mg/mL. For EX40 calibration curve the dilutions were performed using the same solvent to obtain concentrations of 0.3, 0.6, 0.9, 1.2, and 1.5 mg/mL. Each curve point represents the mean value of three different solutions, analyzed in triplicate. The *Linearity* test comprised the regression analysis, ANOVA, and Durbin-Watson test for residues. *Repeatability* was calculated from the analysis of nine working solutions of ilexoside II and EX40 using the intermediate concentration from calibration curves. *Intermediate precision* was assessed by the comparison of three calibration curves of ilexoside II and EX40, prepared in three consecutive days. Results were expressed as relative standard deviation (%RSD). For the *accuracy* test, an EX40 working solution of 0.6 mg/mL was spiked in triplicate with 1.00, 2.00 and 3.00 mL of a 0.24 mg/mL ilexoside II reference solution to a final volume of 10.0 mL, in order to introduce a theoretical peak area increase of 40, 80, and 120%, respectively. The *limit of detection* (LOD) and *limit of quantification* (LOQ) were calculated using the standard deviation of the intercept and slope values according to literature (ICH, 2005).

## 2.5 LC-MS analysis

The LC-MS fingerprint of the MSF was obtained using an LCQ Deca XP instrument (Columbia, USA) coupled to an MS pump Surveyour (USA). The analysis was performed using a Zorban Narrow Bore column (California, USA) with dimensions of 150 x 2.1 mm at 30° C, an ion trap detector and ESI on the negative mode. A linear gradient using formic acid 1% (Mobile phase C) and acetonitrile (Mobile phase D) was established as follow: 0 min–5% B; 47 min–90% B; 53 min–90%B at a flow rate of 0.2 mL/min. The same method was employed to evaluate the Ilexoside II standard. Ilexoside II fragmentation pattern was compared to literature data (Taketa *et al.*, 2004).

## 2.6 Haemolytic Activity

The *in vitro* haemolytic evaluation of MSF was conducted based on the method described by Rönnerberg et al., (1995) with some modifications. Human Red blood cells obtained from a healthy adult volunteer were centrifuged at 2.01 g for 10 min, washed twice with Phosphate-Buffered Saline (PBS) pH 7.2 and were diluted to a 0.5% suspension in PBS. 100µL of cell suspension was added to V-bottomed 96-well microplates in addition to other 100 µL of mate and Quillaja enriched saponin fractions dissolved in PBS and ranging in concentration from 0.0125 to 5.0 mg/mL. A 10% solution of Triton X-100 was used as a positive control and PBS was used as negative one. An enriched saponin fraction from *Quillaja saponaria*, specie widely used as a source of saponins, was also evaluated. Plates were incubated at 37°C for 1 h and centrifuged at 2.01 g for 10 min. The supernatant was transferred from conventional U-bottomed microplates and the absorbance was measured at 540 nm in a Microplate reader (Anthos 2020, UK). The percentage of haemolysis was calculated by comparison with the absorbance of the positive control. The absorbance developed by the PBS negative control was subtracted from all groups. The experiment was performed in triplicate

## 3. Investigations, Results and Discussion

### 3.1 Solid phase extraction of MSF

The LC-UV chromatograms of the total lyophilized extract EX40 and the mate saponin fraction (MSF) produced after solid phase extraction (SPE) are presented in Figure 1. Clearly, the SPE process resulted in the elimination of the majority of compounds detected at earlier short elution times, more likely comprising more polar and low molecular weight compounds found in the lyophilized extract, such as polyphenols.

The yield achieved after SPE was 43.6% (w/w) related to EX40 weight. Reproducibility analysis of the LC-area of the two major saponins from MSF, namely

peaks I and II (Figure 1B), showed a relative standard deviation of 8.17 and 5.96%, respectively. These values also include the variation from the analytical method itself.

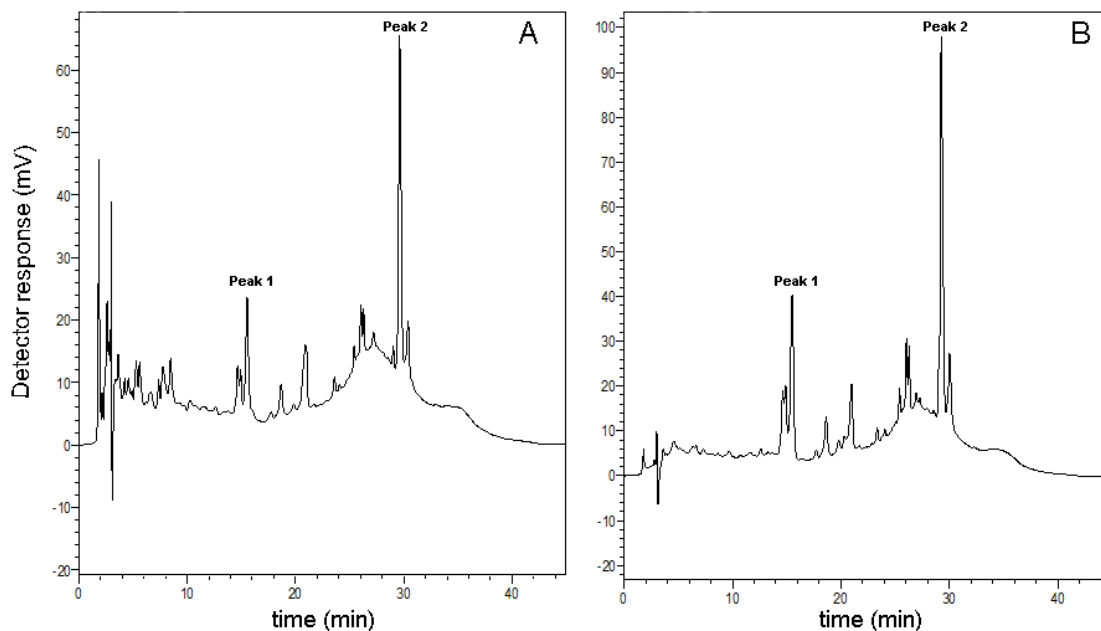


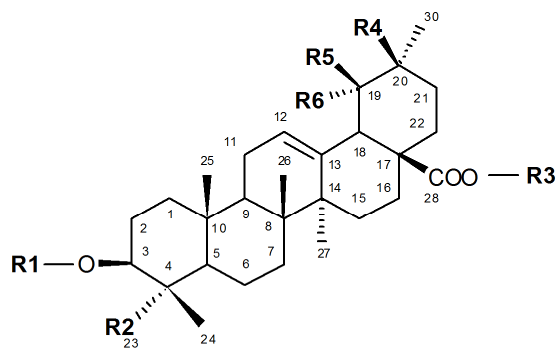
Figure 1. LC-chromatograms of EX40 (A) and MSF (B) at 1.0 mg/mL, after detection at 205 nm.

### 3.2 LC-UV analysis and validation

The analytical method objective was the analysis and quality-control of the fruits lyophilized extract (EX40), and can also be applied to the fingerprint analysis of MSF (Figure 1B). The development of a wide polarity range method was confirmed by the analysis of reference saponins obtained from *Ilex* species displaying a variety of substitution patterns. The method also demonstrates the presence of less polar saponins in EX40 and complements our earlier work in which the most polar saponins found in mate lyophilized extract were assayed using LC-UV (Pavei *et al.*, 2007).

The reference saponins analyzed in the present work were all previously isolated from different *Ilex* species and their chemical features are described in Figure

2 along with the individual retention times. The retention times observed for these reference saponins varied from 15.6 to 29.2 with ilexoside II being the most polar saponin under the current experimental conditions. The monodesmosidic brevicuspisaponin-1 presented the higher retention time.



Saponin	Source	R1	R2	R3	R4	R5	R6	RT*
Illexoside II	<i>I. paraguariensis</i>	$\beta$ -D glc-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-ara	CH <sub>3</sub>	$\beta$ -D glc	H	CH <sub>3</sub>	OH	15.6
Matesaponin-4	<i>I. paraguariensis</i>	$\beta$ -D-glc(1 $\rightarrow$ 3)- $\alpha$ -L-rha-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-ara	CH <sub>3</sub>	$\beta$ -D glc- $\beta$ -D glc	H	CH <sub>3</sub>	H	19.9
Pedunculoside	<i>I. taubertiana</i>	H	CH <sub>2</sub> OH	$\beta$ -D glc	H	CH <sub>3</sub>	OH	20.2
E8	<i>I. theezans</i>	$\beta$ -D-glc(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-gal	CH <sub>3</sub>	$\beta$ -D glc	CH <sub>3</sub>	H	H	22.7
E7	<i>I. dumosa</i>	$\alpha$ -L-ara-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-gal	CH <sub>3</sub>	$\beta$ -D glc	CH <sub>3</sub>	H	H	24.1
Brevicuspisaponin-1	<i>I. brevicuspis</i>	$\alpha$ -L-ara	CH <sub>2</sub> OH	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	29.2

\* RT: Retention Time

Figure 2. Structures and retention times of selected reference saponins



Linear regression analysis showed a good fit to the calibration curves of ilexoside II and EX40 as reflected by  $R^2$  values greater than 0.99 (Table 1). The LOD and LOQ estimated from the calibration curve slopes were similar for both ilexoside II and the lyophilized extract. The analysis of standardized residues and the Durbin-Watson test showed an absence of autocorrelation and no outliers

Table 1. Linear regression analysis, detection and quantification limits for ilexoside II and EX40.

<b>Parameters</b>	<b>Ilexoside II</b>	<b>EX40</b>
Regression equation	$y = 4.0 \times 10^6 x - 14318$	$y = 323860x + 8122.9$
Coefficient of determination ( $R^2$ )	0.9983	0.9972
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.030	0.033
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.091	0.100

The RSD for repeatability and intermediate precision of ilexoside II was 2.86% and 5.09%, respectively. For EX40 the repeatability was 3.21% and the intermediate precision was 4.15 %. Taking into account the samples complexity, the system showed a satisfactory response with an RSD below 5%.

The accuracy data show a negligible interference of matrix compounds. For lower spiking, which corresponds to a theoretical ilexoside II area increase of 40%, the recovery was  $102.00 \pm 4.10$ . For the intermediate addition, equivalent to a theoretical increase of 80%, recovery was  $100.21 \pm 0.50$  and for the higher addition (120% theoretical increase),  $95.48 \pm 0.75$ . Ilexoside II content found in EX40 was 8.20% (w/w). Considering the peaks showing molecular weights within the range expected for saponins and no absorption above 215 nm, the lyophilized extract EX40 total saponin content can be estimated in 47.60 % (w/w), expressed as Ilexoside II.

### 3.3 LC-MS analysis

The chemical investigation of all saponins presented in MSF is outside the scope of this work. Nevertheless, LC-MS analysis (Figure 3) shows that all peaks detected in MSF have molecular weights within the range expected for mate saponins (Schenkel *et al.*, 2003) and none of them shows absorption above 215 nm, confirming that all detectable low molecular weight compounds were eliminated. Ilexoside II LC-UV chromatogram and fragmentation after LC-MS analysis are presented in Figure 4A and 4B, respectively. The  $m/z$  values of 951 and 789 were detected on both ilexoside II and the EX40. The  $m/z$  of 951 corresponds to the MW of ilexoside plus a sodium ion (Taketa *et al.*, 2004). The loss of glucose on C28 is proposed as the fragmentation in the MS-MS analysis leading to the detection of an  $m/z$  of 789 (Taketa *et al.*, 2004). No other peaks were detected on MS and MS-MS analysis on Ilexoside II.

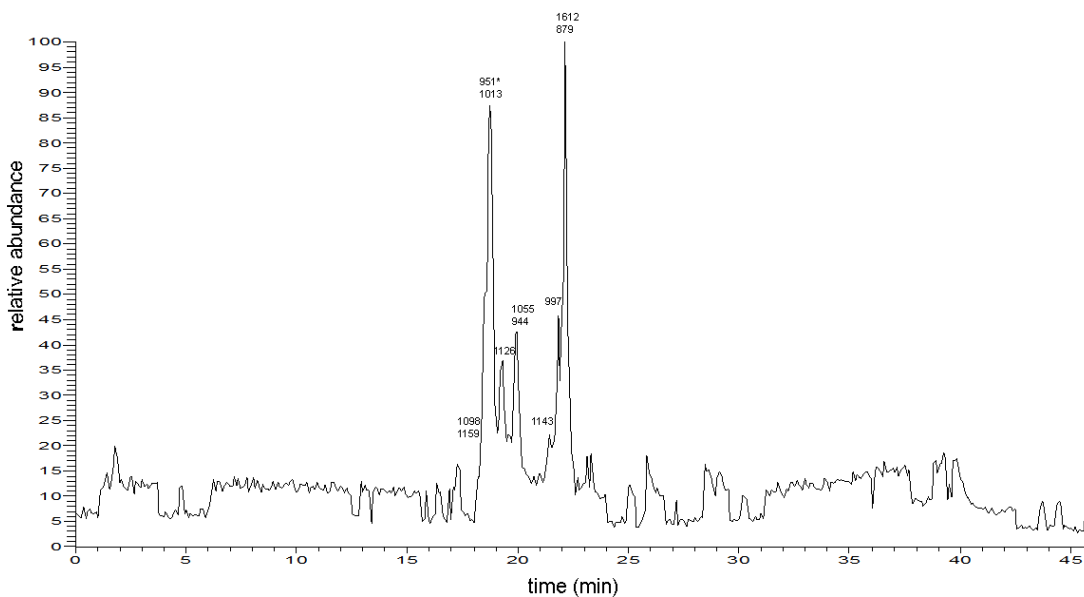


Figure 3. Chromatograms of MSF with mass detection: ESI in the negative mode,  $m/z$  500-1700. \* Ilexoside II.

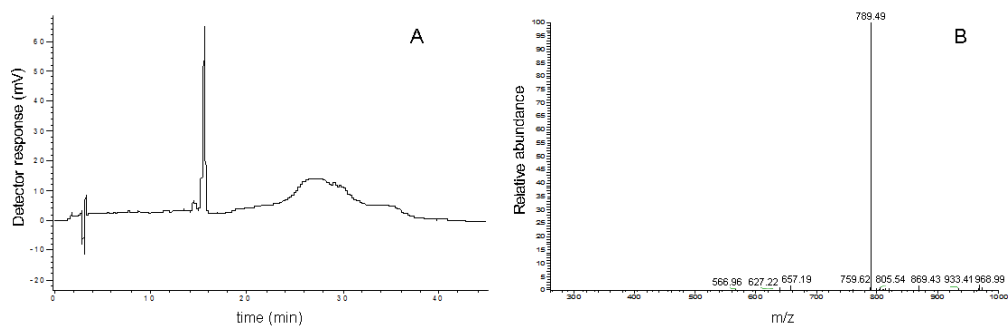


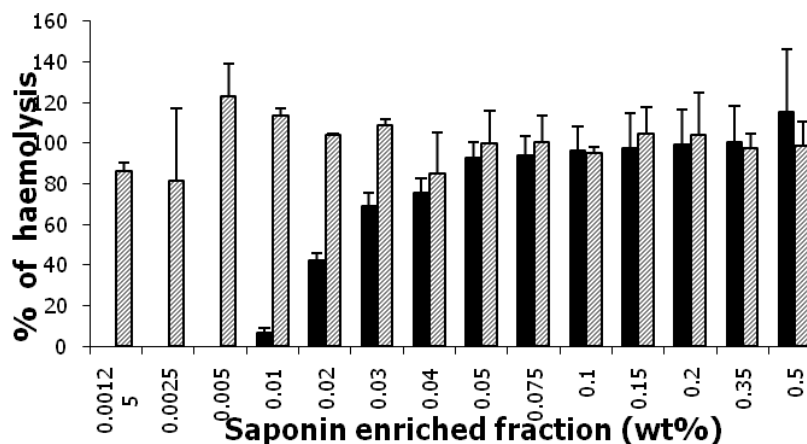
Figure 4. **A:** LC-chromatogram of ilexoside II at 0.5 mg/mL after detection at 205 nm; **B:** LC-MS-MS of ilexoside II: m/z 789.49.

### 3.4 Haemolytic activity

The haemolytic activity of MSF was assayed and compared to an enriched saponin fraction from *Quillaja saponaria*, which represents one of the most employed sources of saponins.

According to Figure 5 the  $HD_{100}$  of MSF can be estimated at 0.05 wt% or 0.54 mM of total saponins expressed as Ilexoside II. For *Quillaja* saponins instead, the  $HD_{100}$  is about 0.0125 mg/mL or 0.0077 mM, considering a MW of 1650 (Mitra; Dungan, 2001). In contrast with what was observed from mate leaves (Gosmann, 1989), which show an absence of haemolytic properties, MSF shows some degree of activity, however much weaker than *Quillaja* saponins. Voutquenne *et al.*, (2002) evaluated 59 samples of isolated, mixtures and synthetic saponins aiming the evaluation of their haemolytic properties. Twelve saponins showed high activity with a haemolytic index higher than 50,000. These saponins presented  $HD_{100}$  from 0.0075 to 0.075 mg/mL,  $\alpha$  and  $\beta$ -aescine being the most active ones, with  $HD_{100}$  of 0.0075 mg/mL or 0.0066 mM. In comparison, *Quillaja* saponins can be classified as strongly haemolytic while MSF is comparable to the less haemolytic saponins which showed  $HD_{100}$  ranging from 0.025 to 0.1 wt%.

Figure 5. Haemolytical activities of saponin enriched fractions: mate (black bars) vs Quillaja (grey bars).



Hence, the analysis of several reference saponins allowed us to develop a wide-range polarity method in order to estimate total saponin contents and to quantify ilexoside II in the lyophilized extract from *Ilex paraguariensis* green fruits as well establishing a fingerprint for this mate saponin enriched fraction. The method showed to be linear, precise and accurate. High saponin yield and good reproducibility could be attained by the polymer solid phase extraction method applied. Moreover, LC-MS analysis showed molecular weights within the range of saponins for all the peaks observed. The mate saponin fraction presented low toxicity toward red blood cells, affording favourable evidence toward its potential use for biological and technological purposes.

## **Acknowledgments**

The authors are grateful to the Brazilian National Council for Research and Development (CNPq/Brazil) for financial support and scholarships granted to M. P. G. Peixoto and J. Treter and to Ervateira Barão for the donation of the plant material. The reference saponins were kindly gift from Prof. Grace Gosmann (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). Anna Przyborowska (Kings College, London) is gratefully acknowledged for the LC-MS running. Maria Paula is grateful to Professor David Cowan and Prof. Peter Hylands (Kings College, London) for the help and discussion on LC-MS data analysis and to Huiying Zhao (Kings College, London) for the help on LC-UV running.

## References

- Benichou A, Aserin A, Garti N (1999) Steroid-saponins from fenugreek seeds: Extraction, purification and surface properties. *J Dispers Sci Technol* 20: 581-605.
- Dini I, Tenore GC, Dini A (2009) Saponins in *Ipomoea batatas* tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. *Food Chem* 113: 411-419.
- Gauthier C, Legault J, Girard-Lalancette K, Mshvildadze V, Pichette A (2009) Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. *Bioorg Med Chem* 17: 2002-2008.
- Gosmann G (1989) Saponinas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (erva-mate) Porto Alegre, Brazil: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 108 p. MSc Thesis.
- Güçlü-Ustundag O, Mazza G (2007) Saponins: Properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr* 47: 231-258.
- Gugliucci A, Stahl AJC (1995) Low density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Mol Biol Int* 35: 47-56.
- Guy B (2007) The perfect mix: Recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol* 5: 505-517.
- Heck CI, Mejia EG (2007) Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci* 72: 138-151.
- Hiller K (1987) New results on the structure and biological activity of triterpenoid saponins. In: Hostettmann K (ed.) *Biologically active natural products*, 1<sup>st</sup> ed., Oxford, p. 167-184.
- ICH (2005) International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, validation of analytical procedures: text and methodology, Q2(R1).
- Khanna VG, Kannabiran K (2008) Antimicrobial activity of saponin fractions of the leaves of *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrata*. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 2737-2740.
- Liu W, Zheng Y, Han L, Wang H, Saito M, Ling M, Kimura Y, Feng Y (2008) Saponins (Ginsenosides) from stems and leaves of *Panax quinquefolium* prevented high-fat diet-induced obesity in mice. *Phytomedicine* 15: 1140-1145.
- Lunceford N, Gugliucci A (2005) *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia* 76: 419-427.

- Ma X, Xie L, Liu L, Tang Q, Wan Z, Li Y (2008) Simultaneous Quantification of Seven Main Triterpenoid Saponins in Radix et Rhizoma Clematidis by LC-ELSD. *Chromatographia*: 1-7.
- Milgate J, Roberts DCK (1995) The nutritional and biological significance of saponins. *Nutr Res* 15: 1223-1249.
- Mitra S, Dungan SR (2001) Cholesterol solubilization in aqueous micellar solutions of quillaja saponin, bile salts, or nonionic surfactants. *J Agric Food Chem* 49: 384-394.
- Montanha JA (1990) Estudo químico e biológico das saponinas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Aquifoliaceae). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio grande Sul. 92 p. MSc Thesis.
- Müller V, Chavez JH, Reginatto FH, Zucolotto SM, Niero R, Navarro D, Yunes RA, Schenkel EP, Barardi CRM, Zanetti CR, Simões CMO (2007) Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. *Phytother Res* 21: 970-974.
- Nord LI, Kenne L (1999) Separation and structural analysis of saponins in a bark extract from *Quillaja saponaria* Molina. *Carbohydr Res* 320: 70-81.
- Pamplona Mosimann AL, Wilhelm-Filho D, Da Silva EL (2006) Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Biofactors* 26: 59-70.
- Park MK, Park JH, Han SB, Shin YG, Park IH (1996) High-performance liquid chromatographic analysis of ginseng saponins using evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A* 736: 77-81.
- Park SY, Choi HS, Yook CS, Nohara T (2005) A new lupane glycoside from the leaves of *Acanthopanax koreanum*. *Chem Pharm Bull* 53: 97-99.
- Pavei C (2004) Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 134 p. MSc Thesis.
- Pavei C, Guzatto P, Ros Petrovick P, Gosmann G, González-Ortega G (2007) Development and validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (mate) fruits. *J Liq Chromatogr Related Technol* 30: 87-95.
- Pillion DJ, Recchia J, Wang P, Marciani DJ, Kensil CR (1995) DS-1, a modified *Quillaja* saponin, enhances ocular and nasal absorption of insulin. *J Pharm Sci* 84: 1276-1279.
- Qin F, Ye YP, Sun HX (2006) Haemolytic activity and adjuvant effect of notoginsenoside K from the roots of *Panax notoginseng*. *Chem Biodivers* 3: 1144-1152.

Rönnerberg B, Fekadu M, Morein B (1995) Adjuvant activity of non-toxic Quillaja saponaria Molina components for use in ISCOM matrix. *Vaccine* 13: 1375-1382.

Schenkel EP, Gosmann G, Athayde ML (2003) Saponinas. In: UFSC EdUEd (ed.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 5<sup>th</sup> ed., Porto Alegre/Florianópolis, p. 711-740.

Schenkel EP, Gosmann G, Montanha JA, Heizmann BM, Athayde ML, Taketa ATC, Pires VS, Guillaume D (1997) Saponins from Mate (*Ilex paraguariensis*) and other South American Ilex species: ten years research on Ilex saponins. *Cienc Cult* 49: 359-363.

Schubert A, Pereira DF, Zanin FF, Alves SH, Beck RCR, Athayde ML (2007) Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Pharmazie* 62: 876-880.

Taketa ATC, Breitmaier E, Schenkel EP (2004) Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Mate). *J Braz Chem Soc* 15: 205-211.

Voutquenne L, Lavaud C, Massiot G, Le Men-Olivier L (2002) Structure-activity relationships of haemolytic saponins. *Pharm Biol* 40: 253-262.

Yoo HH, Kwon SW, Park JH (2006) The cytotoxic saponin from heat-processed *Achyranthes fauriei* roots. *Biol Pharm Bull* 29: 1053-1055.

Young CS, Dolan JW (2004) Success with evaporative light-scattering detection, part II: Tips and techniques. *LC-GC Europe* 17: 192-199.



*CAPÍTULO 3*

*AVALIAÇÃO BIOLÓGICA*

---

## **Introdução**

As saponinas, em função de sua capacidade de interação com membranas biológicas e em alguns casos de desencadear processos apoptóticos, possuem uma gama de atividades biológicas. Nesse trabalho, duas atividades importantes foram selecionadas: I) atividade tricomonocida *in vitro*, II) capacidade de modular a resposta imune como adjuvantes em vacinas, utilizando modelo *in vivo*.

A atividade tricomonocida é apresentada neste capítulo sob a forma de artigo aceito para publicação no periódico *Latin American Journal of Pharmacy*. A atividade imunoadjuvante encontra-se incluída em anexo à tese, sob a forma de artigo.

*Anti-Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Ilex paraguariensis* (mate) fruits

Janine Treter<sup>a</sup>, Maria P. G. Peixoto<sup>a</sup>, Raquel B. Giordani<sup>b</sup>, Carine L. Holz<sup>c</sup>; Paulo M. Roehe<sup>d</sup>,  
Tiana Tasca<sup>b</sup>, George G. Ortega<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil, Phone number: +55-51-3308-5278; fax number: +55-51-3308-5437.

<sup>b</sup>Laboratório de Pesquisa em Parasitologia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup>CIRAD, Département Systèmes Biologiques, UMR15 "Contrôle des maladies animales émergentes et exotiques", Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

<sup>d</sup>Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Fepagro Saúde Animal, Estrada Municipal do Conde, 6000, 92990-000, Eldorado do Sul, Brazil.

\* Corresponding author: [ortega@farmacia.ufrgs.br](mailto:ortega@farmacia.ufrgs.br)

**Abstract**

This study evaluates the in vitro anti-trichomonads activity of a saponin enriched fraction (MSF) obtained from the fruits of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Aquifoliaceae). The MSF showed better anti-trichomonads activity than polysorbate and tyloxapol. A similar activity was obtained for quillaja saponins, but this fraction presented the highest cytotoxicity to mammalian cells as follows: quillaja > tyloxapol > polysorbate 80 > MSF. Neither the co-addition of MSF and metronidazole (MTZ) nor the pretreatment of the trophozoites with MSF prior to the addition of MTZ elicited a significant effect on MTZ activity.

**Keywords:** citotoxicity, *Ilex paraguariensis*

## 1. Introduction

Trichomonosis, caused by the flagellated protozoan *Trichomonas vaginalis*, is the most prevalent non-viral, sexually transmitted disease (STD) <sup>1</sup>. Vaginitis due to *T. vaginalis* clinically manifests with symptoms of vaginal itching, odor, and discharge <sup>2</sup>. Trichomonosis among men can cause non-chlamydial, non-gonococcal urethritis, commonly with mild symptoms <sup>3</sup>. There are serious health consequences for patients with trichomonosis, including adverse pregnancy outcomes <sup>4</sup>, predisposition to cervical and prostate cancer <sup>5,6</sup>, and increased infertility <sup>7</sup> and susceptibility to HIV seroconversion <sup>8,9</sup>.

Metronidazole (MTZ) is the drug of choice against *T. vaginalis* since the 60's decade, nevertheless, the occurrence of side effects and cases of resistance stimulate the search of new anti-trichomonads compounds <sup>10-12</sup>. In addition to synthetic drugs with alternative sites of action <sup>13-16</sup>, natural products such as plant purified fractions/extracts were investigated on recent antiprotozoal studies <sup>17-21</sup>. Saponins, found mainly in superior plants, are amphiphilic molecules comprised of a triterpenic or steroid core to which one or more sugar chains are attached <sup>22</sup>. Recently, a significant anti-trichomonads activity with a mechanism of action unrelated to MTZ was reported for a saponin enriched fraction obtained from *Sapindus mukorossi* Gaertm <sup>23</sup>. In this context, the ability to form complexes with steroids, proteins and phospholipids, and the surface active properties of the saponins make them active upon several microorganisms, including parasites <sup>23-26</sup>.

*Ilex paraguariensis* A. St. Hil. is a saponin-rich specie widely known in South American countries because the use of their leaves in the production of stimulant tea-like beverages. The worldwide production of mate was estimated at around 900,000 tons/year with Argentina, Paraguay and Brazil being the main producers <sup>27</sup>. Nevertheless, fruits are considered a by-product of industry discarded before mate roasting <sup>28</sup>. Phytochemical studies on mate saponins indicated the prevalence of triterpenoid glycosides in their leaves and green fruits <sup>29-32</sup>. In our previous work we obtained a mate saponin enriched fraction (MSF) from lyophilized extract of mate green fruits through solid phase extraction with good process reproducibility and a

yield close to 45% (w/w). MSF showed a very low cytotoxicity against red blood cells, one of the main drawbacks of saponins *in vivo* application<sup>33</sup>.

Considering the importance of trichomonosis in public health, the necessity of new alternatives for the treatment of this STD, and the potential use of saponins as trichomonocidal agents, the aim of this study was to investigate the anti-trichomonads activity as well as the in vitro cytotoxicity against eukaryotic cells of a saponin enriched fraction obtained from green fruits of *Ilex paraguariensis*. In addition, the results were compared to synthetic surface active compounds, tyloxapol and polysorbate 80, and to a commercial saponin fraction from *Quillaja saponaria*.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Chemicals**

Quillaja saponins fraction (S-4521), tyloxapol, MTT ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diferyl-tetrazolium bromide]), metronidazole (MTZ), and the antibiotics penicillin-streptomycin were purchased from Sigma. Polysorbate 80 was from Merck.

### **2.2 Saponin enriched fraction**

Mate green fruits were harvested in January 2008 and kindly supplied by Ervateira Barão (Barão de Cotegipe, RS, Brazil). A voucher specimen was deposited at the Federal University of Rio Grande do Sul Herbarium under the code ICN 125105 (Porto Alegre, Brazil). Green fruits were manually separated from leaves and stalks, dried at 35 °C for 72 h in a forced ventilation oven (Memmert, Germany) and milled using a cutter mill (Retsch SK1, Germany). The plant powder (2.1 mm) was firstly macerated with a 40% ethanol solution (10% w/v) during 40 min and afterwards extracted by turbolysis (IKA T-25 basic, Germany) during 15 min avoiding overheating. The extract was filtered and concentrated to one-half of its original volume under vacuum in a rotating evaporator (Büchi R114) and further lyophilized

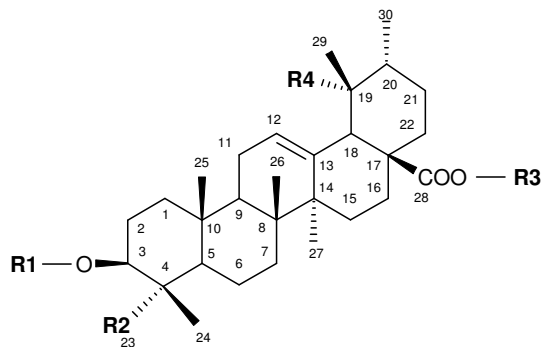
(Edwards, USA). The mate saponin enriched fraction (MSF) was obtained from lyophilized extract by solid phase extraction (Diaion HP-20, Supelco, USA) and a methanol:water gradient. The saponins were recovered from the less polar fractions containing methanol 70 and 90% (v/v)<sup>34</sup>.

### **2.3 Parasites and culture conditions**

The *T. vaginalis* isolate TV-VP60<sup>35</sup> was used in this study. This fresh clinical isolate was obtained from epidemiological survey in Porto Alegre city, Rio Grande do Sul, Brazil, and it was kindly donated by Dr. Geraldo Attilio De Carli (PUCRS, Brazil). Trichomonads were cultured axenically in vitro in trypticase-yeast extract-maltose (TYM) medium<sup>36</sup> (pH 6.0), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated serum, and incubated at 37°C (±0.5). Organisms in the logarithmic phase of growth and exhibiting more than 95% viability and normal morphology were harvested, centrifuged and resuspended on new TYM medium for anti-trichomonads activity assays. All experiments were performed in triplicate and the results were obtained from at least four independent cultures (3n).

### **2.4 Anti-trichomonads activity**

The anti-trichomonads activity of MSF, tyloxapol, polysorbate 80 and quillaja was determined in vitro. Parasites were counted with a haemocytometer and adjusted to  $5.0 \times 10^5$  trophozoites/mL in TYM medium. The MSF was added to this incubation system at final concentration range from 0.008 to 0.5 wt% or 0.086 to 5.38 mM, if expressed as ilexoside II (Figure 1, MW of 929.029), the major saponin identified on MSF. Tyloxapol, quillaja and polysorbate 80 were analyzed at a concentration of 0.5 wt%. Two controls were carried out: parasites only, and a test with MTZ at 12.5 µg/mL as positive control. The results were expressed as the percentage of living organisms compared with parasites control after 24 h of incubation considering motility and normal morphology.



<b>R1</b>	<b>R2</b>	<b>R3</b>	<b>R4</b>
$\beta$ -D-Glc1 $\rightarrow$ 3 $\alpha$ -L-Ara1 $\rightarrow$	CH <sub>3</sub>	$\beta$ -D-Glc1 $\rightarrow$	HO

Figure 1. Ilexoside II, the major identified saponin found on mate saponin enriched fraction, obtained on green fruits of *Ilex paraguariensis*.

In order to investigate synergic or time dependent effects of the saponin sample and metronidazole, two modifications were made to perform the anti-trichomonads activity assays. First, MSF at 0.02 wt% was associated to MTZ at 6.25  $\mu$ g/mL (MIC/2) and 12.5  $\mu$ g/mL (MIC) and the anti-protozoal effect evaluated after 24 h. Second, the cultures were treated with MSF (0.02 wt%) during 2 h prior to the addition of MTZ, at 6.25  $\mu$ g/mL and 12.5  $\mu$ g/mL, and then, the anti-trichomonads activity was also evaluated after 24 h. as shown in figure 2. Each test was carried out on triplicate, with at least three independent experiments using three different cultures. Statistical analysis was performed on Excel 2003 using the Student's  $t$ -student test ( $P < 0.05$ ).

## 2.5 Cell cytotoxicity assay

MTT cytotoxicity assay was performed on an established method with modifications<sup>37</sup>. Briefly, Madin Darby Bovine Kidney cells (MDBK ATCC CCL-22) were cultured in Eagle's minimal essential medium (E-MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and the antibiotics penicillin and streptomycin at usual



concentrations<sup>38</sup>. Cells were seeded on 96-well microplates at a concentration of  $4.0 \times 10^4$  per/well and maintained at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Confluent cells were treated with MSF and surfactants tyloxapol, polysorbate 80 and quillaja dissolved in E-MEM. After 24 h, the supernatant was removed and replaced by 40 µL of a 2.0 mg/mL MTT solution in serum-free medium. The medium was then removed and 100 µL of isopropyl alcohol was added to each well. Plates were submitted to constant agitation for 30 min at 37 °C and the absorbance was detected at 550 nm using a microplate ELISA Reader (Anthos 2020, Austria). Results were expressed as the percentage of viable cells comparing the samples absorbance to the untreated control.

### 3. Results and Discussion

The effect of the mate saponin enriched fraction (MSF) upon fresh cultures of *T. vaginalis* is showed in Figure 2.

MSF presented anti-trichomonads effect at increasing concentrations: at 0.008 wt% the trophozoites viability was close to 100%, while at 0.02 wt%, it was observed 80% of parasites viability. Importantly, 0.2 wt% MSF or 2.1 mM expressed as Ilexoside II which also corresponds to nearly 5-fold the critical micelle concentration (CMC) of MSF, caused total lethality of *T. vaginalis* trophozoites. The saponins from *Sapindus mukorossi*, at 0.001 wt%, reduced 100% of *T. vaginalis* viability after 24 h-treatment<sup>23</sup>. The CMC for *S. mukorossi* was determined as 0.045 wt%<sup>39</sup> being the anti-trichomonads effect observed at a concentration lower than the CMC, in opposite to our results to MSF.

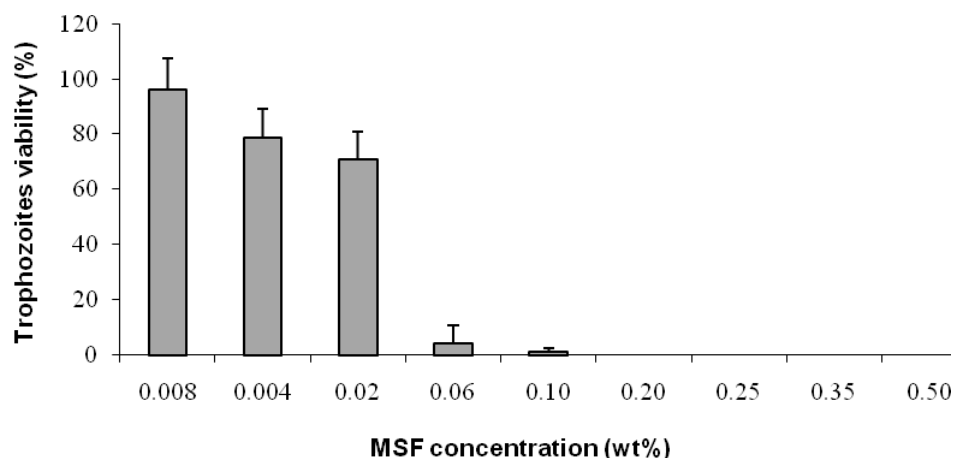


Figure 2. Susceptibility of *T. vaginalis* trophozoites to MSF ranging concentration from 0.008 to 0.5 wt% (0.086 to 5.38 mM).

The effect of the synthetic surfactants polysorbate 80 and tyloxapol as well as saponins from *Quillaja* are summarized on Table 1.

Table 1. Susceptibility of *T. vaginalis* trophozoites after 24 h of exposure to MSF and references substances at 0.5 wt%.

Treatment (0.5 wt%)	Concentration x CMC <sup>b</sup>	Trophozoites viability (%)
MSF <sup>a</sup>	12.5	0
<i>Quillaja</i>	11	0
Polysorbate 80	100	52.3 ± 8.2
Tyloxapol	1.85	44.6 ± 1.8

<sup>a</sup> Mate saponin enriched fraction

<sup>b</sup> Equivalent to x-fold the critical micellar concentration (CMC)

All substances demonstrated anti-trichomonads activity when used at concentrations higher than the respective CMC values. Quillaja and MSF were able to cause 100% of parasites lethality, being more active than the non-ionic surfactants polysorbate 80 and tyloxapol. A viability of 50%, approximately, was observed to polysorbate 80 and tyloxapol after 24 h of incubation.

The surface activity as well as the capacity of surfactants to form complex micelles with drugs is a time-dependent effect<sup>40, 41</sup>. In order to gain insights on MSF mechanism of action and drug saponin interaction, a pretreatment with MSF before the MTZ addition (at the MIC/2 and MIC values) was performed to evaluate the occurrence of a potential increase of MTZ permeability throughout the trophozoites membrane. Moreover, MTZ (at the MIC/2 and MIC values) and MSF were tested in co-addition to assess the induction of some micellization effect. MTZ (MIC/2) was able to reduce the trophozoites viability to 24.3%. When 0.02 wt% MSF was co-added with MTZ (MIC/2), the parasites viability decreased to 21.5%, however the difference between both effects was not statistically significant ( $P_{T \leq t; \text{two-tailed}} = 0.216$ ). The pretreatment with MSF before the MTZ (MIC/2) did not enhance MTZ anti-trichomonads activity, in fact, this association increased the number of viable trophozoites (Fig. 3A). Both the co-addition and the pretreatment of trophozoites with MSF and MTZ (MIC) did not alter the anti-trichomonads effect of MTZ ( $P_{T \leq t; \text{two-tailed}} = 0.136$  and  $0.185$ , respectively) (Fig. 3B).

This found suggests that MSF operates neither by a synergistic mechanism nor by improvement of MTZ absorption via membrane cell permeation. In that account, preliminary electron microscopy studies conducted by our group had showed that mate saponins are able to form rather intricate micelle-like structure (unpublished results). However, the results here obtained suggest no interaction between mate saponins micelles and MTZ.

An important drawback for the clinical use of saponins along with the haemolytical effect is probably the induction of cytotoxicity toward mammalian cells.

In order to investigate the cytotoxic effect of MSF an assay was performed against MDBK cells, a model of non-cancerous mammalian epithelial cell line (Fig. 4).

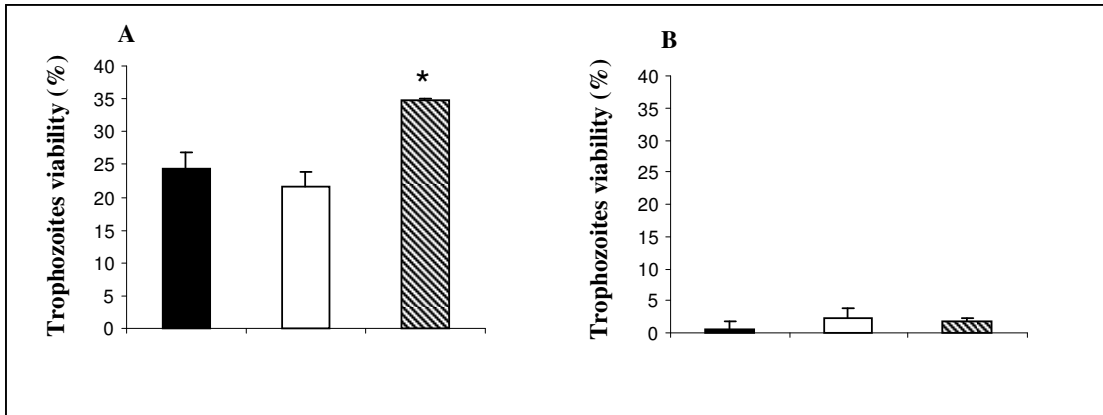


Figure 3. Susceptibility of *T. vaginalis* trophozoites after 24 h of exposure to: (A) MTZ at MIC/2 (black bars); Co-addition of MSF 0.02 wt% + MTZ MIC/2 (white bars); Pretreatment with MSF 0.02 wt% + MTZ MIC/2 (hatched bars); (B) MTZ at MIC (black bars); Co-addition of MSF 0.02 wt% + MTZ MIC (white bars); Pretreatment with MSF 0.02 wt% + MTZ MIC (hatched bars). \*Significant at  $P < 0.05$  (Student's  $t$ -test).

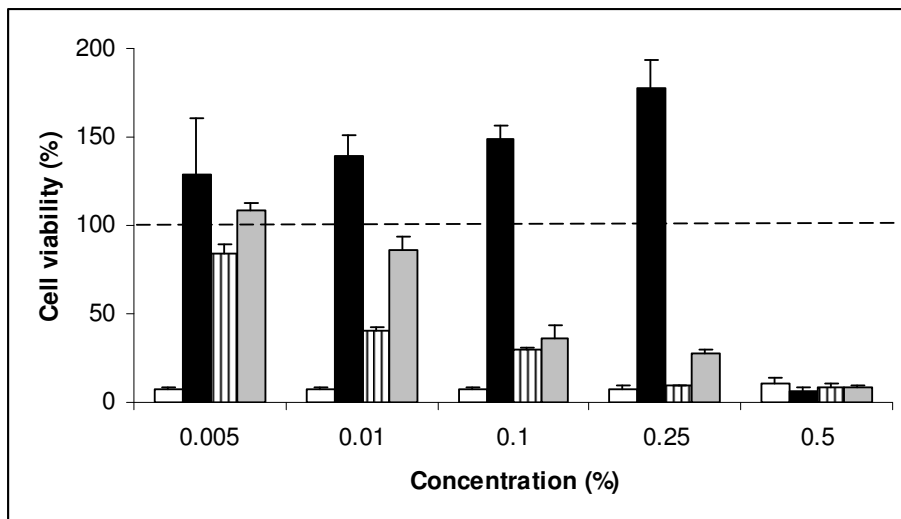


Figure 4. Cytotoxicity of saponins and synthetic surfactants against a mammalian cell using the MTT assay: quillaja (white bars); MSF (black bars); tyloxapol (hatched bars) and polysorbate 80 (gray bars).

The enriched fraction of quillaja saponins was the most cytotoxic compound, causing almost total lethality in all concentrations evaluated. Tyloxapol was toxic at concentrations ranging from 0.05 to 0.5 wt% and polysorbate 80, at 0.5, 0.25, 0.1 wt%, being slightly toxic at 0.05 wt%. These synthetic surfactants agents are widely used in pharmaceutical formulation as excipients, in their most as solubilization agents, whose use is FDA-approved<sup>42, 43</sup>. Importantly, MSF was cytotoxic only at 0.5 wt% or 5.4 mM expressed as ilexoside II. Therefore, MSF was not cytotoxic at anti-trichomonads concentrations.

#### **4. Conclusion**

The saponin enriched fraction obtained from *Ilex paraguariensis* green fruits demonstrated moderate trichomonocidal activity at 0.06 wt%. Moreover, this concentration was not cytotoxic to a mammalian epithelial cell line. The MSF anti-trichomonads activity was lower than MTZ and superior to the synthetic surfactants tyloxapol and polysorbate 80. Additional work is necessary to provide details regarding the mechanism of action of MSF anti-trichomonads activity.

#### **5. Acknowledgments**

The authors are grateful to the Brazilian National Council for Research and Development (CNPq/Brazil), FAPERGS (Brazil), and CAPES (Brazil) for scholarships and financial support and to Ervateira Barão for the donation of the plant material.

## 6. References

1. WHO - World Health Organization (2001) Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections, Overview and Estimates, Switzerland.
2. Mabey, D., J. Ackers & Y. Adu-Sarkodie (2006) *Sex. Transm. Infect.* **82**: 26-7.
3. Krieger, J.N. (1990) “*Epidemiology and clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in men*”, in: “*Trichomonads parasitic in humans*”, (B.M. Honigberg, ed.), Springer-Verlag, New York, pp. 235-45.
4. Cotch, M.F., J.G. Pastorek II, R.P. Nugent, S.L. Hillier, R.S. Gibbs, D.H. Martin, D.A. Eschenbach, R. Edelman, J.C. Carey, J.A. Regan, M.A. Krohn, M.A. Klebanoff, A.V. Rao & G.G. Rhoads (1997) *Sex. Transm. Dis.* **24**: 353-60.
5. Viikki, M., E. Pukkala, P. Nieminen & M. Hakama (2000) *Acta Oncol.* **39**: 71-5.
6. Sutcliffe, S., E. Giovannucci, J.F. Alderete, T.H. Chang, C.A. Gaydos, J.M. Zenilman, A.M. de Marzo, W.C. Willette & E.A. Platz (2006) *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **15**: 939-45.
7. Grodstein, F., M.B. Goldman & D.W. Cramer (1993) *Am. J. Epidemiol.* **137**: 577-84.
8. Chesson, H.W., J.M. Blandford & S.D. Pinkerton (2004) *Sex. Transm. Dis.* **31**: 547-51.
9. McClelland, S., L. Sangaré, W.M. Hassan, L. Lavreys, K. Mandaliya, J. Kiarie, J. Ndinya-Achola, W. Jaoko & J.M. Beten (2007) *J. Infect. Dis.* **195**: 698-702.
10. Land K.M. & P.J. Johnson (1997) *Exp. Parasitol.* **87**: 305-8.
11. Brown, D.M., J.A. Upcroft, H.N. Dodd, N. Chen & P. Ufcroft (1999) *Mol. Biochem. Parasitol.* **98**: 203-14.
12. Meneses-Marcel, A., O.M. Rivera-Borroto, Y. Marrero-Ponce, A. Montero, Y. Machado Tugores, J.A. Escario, A. Gómez Barrio, D. Montero Pereira, J.J. Nogal, V.V. Kouznetsov, C. Ochoa Puentes, A.R. Bohórquez, R. Grau, F. Torrens, F. Ibarra-Velarde & V.J. Arán (2008) *J. Biomol. Screen.* **13**: 785-94.
13. Narcisi, E.M. & W.E. Secor (1996) *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**: 1121-5.
14. Sobel, J.D., P. Nyirjesy & W. Brown (2001) *Clin. Infect. Dis.* **33**: 1341-6.
15. Malagoli, M., T. Ross, A. Baggio, G. Zandomenighi, C. Zanca, C. Casolari & M. Castelli (2002) *Pharmacol. Res.* **46**: 469-72.

16. Cudmore, S.L., K.L. Delgaty, S.F. Hayward-McClelland, D.P. Petrin & G.E. Garber (2004) *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 783-93.
17. Muelas-Serrano, S., J.J. Nogal, R.A. Martínez-Díaz, J.A. Escario, A.R. Martínez-Fernández & A. Gómez-Barrio (2000) *J. Ethnopharmacol.* **71**: 101-7.
18. Vermani, K. & S. Garg (2002) *J. Ethnopharmacol.* **80**: 49-66.
19. Fidalgo, L.M., I.S. Ramos, A.M.M. Álvarez, N.G. Lorente, R.S. Lizima & J.A. Payrol (2004) *Rev. Cubana Med. Trop.* **56**: 230-233.
20. Calzada, F., L. Yépez-Mulia & A. Tapia-Contreras (2007) *J. Ethnopharmacol.* **113**: 248-51.
21. Iwalewa, E.O., N.O. Omisore, C.O. Adewunmi, A.A. Gbolade, O.G. Ademowo, C. Nneji, O.I. Agboola & O.M. Daniyan (2008) *J. Ethnopharmacol.* **117**: 507-11.
22. Francis, G., Z. Kerem, H.P. Makkar & K. Becker (2002) *Br. J. Nutr.* **88**: 587-605.
23. Tiwari, P., D. Singh & M.M. Singh (2008) *J. Antimicrob. Chemother.* **62**: 526-34.
24. Germonprez, N., L. van Puyvelde, L. Maes, M. van Tri & N. de Kimpe (2004) *Tetrahedron* **60**: 219-28.
25. Germonprez, N., L. Maes, L. van Puyvelde, M. van Tri, D.A. Tuan & N. de Kimpe (2005) *J. Med. Chem.* **48**: 32-7.
26. Fuchino, H., S. Sekita, K. Mori, N. Kawahara, M. Satake & F. Kiuchi (2008) *Chem. Pharm. Bull.* **56**: 93-6.
27. Heck, C.I. & E.G. Mejia (2007) *J. Food Sci.* **72**: R138-51.
28. Schubert, A., D.F. Pereira, F.F. Zanin, S.H. Alves, R.C. Beck & M.L. Athayde (2007) *Pharmazie* **62**: 876-80.
29. Gosmann, G., D. Guillaume, A.T. Taketa & E.P. Schenkel (1995) *J. Nat. Prod.* **58**: 438-41.
30. Kraemer, K.H., A.T. Taketa, E.P. Schenkel, G. Gosmann & D. Guillaume (1996) *Phytochemistry* **42**: 1119-22.
31. Martinet, A., K. Ndjoko, C. Terreaux, A. Marston, K. Hostettmann & Y. Schutz (2001) *Phytochem. Anal.* **12**: 48-52.
32. Taketa, A.T.C., E. Breitmaier & E.P. Schenkel (2004) *J. Braz. Chem. Soc.* **15**: 205-11.

33. Peixoto M.P.G., J. Treter, C. Pavei, G.L. Borré, S.G.Verza, S. Cibulski, P.M. Roehle, G. Gosmann, C.A. Dreiss & G.G. Ortega *Pharmazie* submitted paper.
34. Ortega,G.G., C. Pavei, P.R. Petrovick & V.L. Bassani (2005) Brazilian Patent PI0501510-3
35. Michel, R., F. Borges, R. Wiltuschnig, F. Neves, J. Ribeiro, R. Vieiro, P.B. Vieira, G. Bohns, T. Tasca & G.A. de Carli (2006) *Braz. J. Clin. Anal.* **38**:127-30.
36. Diamond L.S. (1957) *J. Parasitol.* **43**: 488-90.
37. Denizot, F. & R. Lang (1986) *J. Immunol. Methods* **89**: 271-7.
38. Paul, J. (1970) *Cell and tissue cultures*. First edition, London, UK.
39. Balakrishnan S., S. Varughese & A.P. Deshpande (2006) *Tenside, surfactants, detergents* **43**: 262-8.
40. Florence A.T. & D. Attwood (2003) *Tensoativos - princípios físico-químicos em farmácia*. Third edition, São Paulo, SP.
41. Sinko P.J. (2008) *Martin - Físico-farmácia e ciências farmacêuticas*. Fifth edition, Artmed, Porto Alegre, RS.
42. Aviv, H., D. Friedman, A. Bar-Ilan & M. Vered (1993) PCT WO 94/05298.
43. Nema, S., R.J. Washkuhn, R.J. Brendel (1997) *J. Pharm. Sci. Tech.* **51**: 166–71.
44. Oliveira-Freitas, E., C.P. Casas, G.P. Borja-Cabrera, F.N. Santos, D. Nico, L.O.P. Souza, L.W. Tinoco, B.P. da Silva, M. Palatnik, J.P. Parente & C.B. Palatnik-de-Sousa (2006) *Vaccine* **24**: 3909-20.
45. Nardin, E.H., G.A. Oliveira, J.M. Calvo-Calle, Z.R. Castro, R.S. Nussenzweig, B. Schmeckpeper, F.B. Hall, C. Diggs, S. Bodison & E. Robert (2000) *J. Infect. Dis.* **182**: 1486-96.
46. Saraiva, E.M., A.F. Barbosa, F.N. Santos, G.P. Borja-Cabrera, D. Nico, L.O.P. Souza, C.O. Mendes-Aguiar, P. Fampa, L.E. Parra, I. Menz, J.G. Dias, S.M. Oliveira & C.B. Palatnik-De-Sousa (2006) *Vaccine* **24**: 2423-31.
47. Schetters, T.H.P.M. & M. Gravendyck (2006) *Parasitology* **133**: S189-S95.



*CAPÍTULO 4*

*CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA FRAÇÃO DE  
SAPONINAS*

---

## **Introdução**

Em virtude da ocorrência de grupamentos de diferentes polaridades em sua molécula, representados pelo seu núcleo triterpênico hidrofóbico e suas cadeias de açúcar, as saponinas apresentam propriedades tensoativas e capacidade de formar micelas. O conhecimento das propriedades físico-químicas é de fundamental importância no desenvolvimento de aplicações.

Este capítulo tem por objetivo avaliar o comportamento das micelas em solução visando determinar o tamanho, forma e seu comportamento reológico. Adicionalmente, o seu potencial de solubilizar compostos pouco solúveis foi avaliado. Dados de concentração superficial de excesso, área por molécula na superfície e pressão de superfície na CMC encontram-se no ANEXO I desta tese. A abordagem matemática referente à determinação dos módulos viscoso e elástico a partir do ensaio de reologia dinâmica encontra-se no ANEXO II.

O trabalho será submetido ao Periódico Journal of Pharmaceutical Sciences.

Micellar aggregates of saponins from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate)

Maria Paula G. Peixoto<sup>a</sup>, Janine Treter<sup>a</sup>, Pedro Ernesto de Resende<sup>a</sup>, Nádyá Pesce da Silveira<sup>b</sup>, George G. Ortega<sup>a</sup>, Margareth J. Lawrence<sup>c</sup>, Cécile A. Dreiss<sup>c</sup>

<sup>a</sup>*Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

<sup>b</sup>*Instituto de Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre RS, Brazil.*

<sup>c</sup>*Pharmaceutical Science Division, King's College London, Franklin-Wilkins Building, 150 Stamford Street, London SE1 9NH, United Kingdom.*

\***Corresponding author:** [cecile.dreiss@kcl.ac.uk](mailto:cecile.dreiss@kcl.ac.uk), phone number: +44-0-207-848-3766

## Abstract

This work reports the physico-chemical characterisation of the micellar structures formed by a saponin fraction obtained from an important South American species, *Ilex paraguariensis* (mate). The mate saponins enriched fraction (MSF) mainly comprises steroidal glycosides and was obtained from mate green fruits through solid phase extraction. The physico-chemical studies focused the determination of the critical micellar concentration (CMC), the size and shape of the micelles using conventional transmission electron microscopy (TEM) as well as Cryo-TEM and small angle neutron scattering (SANS). The rheological behaviour of the solutions up to 4 wt% was also determined using a controlled-strain rheometer. Finally, the MSF ability to solubilise poorly water soluble drugs was assayed using carbamazepine and flurbiprofen as basic and weak acidic drug models. Small spherical micelles of around 20 Å radius were observed in the presence of elongated structures with lengths over 500 nm, possessing a well defined CMC of 0.41 g/L. MSF solutions ranging from 0.25 to 4% (w/v) demonstrated a viscoelastic behaviour independent of concentration. MSF was able to improve the solubility of carbamazepine in the range of 0.13 to 1.5 % (w/v).

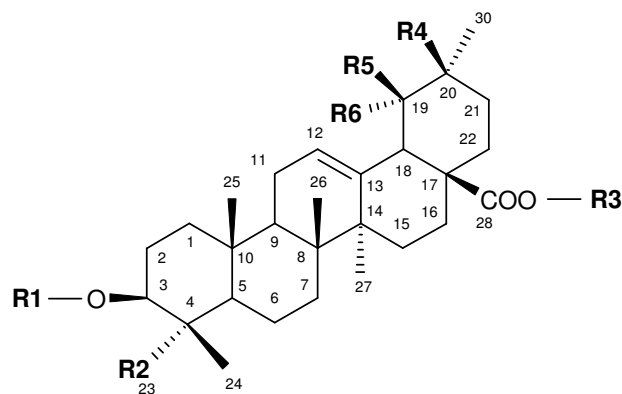
## 1. Introduction

As a result of their interfacial and surface properties as well as their ability to self-assemble into a wide range of structures, surfactants have found many applications in the chemical, pharmaceutical and food industry <sup>1</sup>. Considering the growing interest in replacing petroleum-based surfactants by those derived from naturally occurring renewable sources, saponins have a real potential, due to their high degree of biocompatibility and biodegradability. In the area of pharmaceuticals in particular, they have already been proposed as absorption and dissolution enhancers, immunoadjuvants and immunostimulants <sup>2-5</sup>.

Despite their clear potential as biocompatible surfactants from natural sources, very few studies have been reported on the physico-chemical characterization of saponins, either as mixtures or individual components. The majority of data available have focused on the *Quillaja saponaria* species, where information have been reported on its critical micellar concentration (CMC), micellar size, solution viscosity and the influence of medium conditions such as pH, salt and temperature on such properties <sup>6-8</sup>. For a few other saponin species, some physico-chemical data can be found, mostly on the determination of the CMC and, in some cases, on micellar size, as for instance for the species *Panax notoginseng*, *Glycine max*, *Sapindus mukorossi* and *Gleditsia sinensis* <sup>9-12</sup>.

Given that the production of mixtures of saponins is far more practical than isolated ones, which require lengthy and costly purification processes, not easily scaled-up, and taking into account the fact that such mixtures, when comprised of similar chemical structures may display synergistic activity, we report here the characterisation of physico-chemical properties of a saponin fraction extracted from the Southern Latin American specie, *Ilex paraguariensis* (mate). The species is well known due to the consumption of an herbal tea-like beverages made from its leaves, which has stimulant properties. Due to its importance and increased consumption, the species has recently been the subject of a review on its chemical and technological properties <sup>13</sup>. Besides polyphenols and methylxantines, which are responsible for its

stimulant and antioxidant activities, mate is also a saponin-rich species<sup>14</sup>. Saponins can be found in both the leaves and fruits of mate with a higher accumulation in the latter one. However, the fruits are considered as a waste product from the mate leaves industry and currently have no application<sup>15</sup>. The systematic phytochemical work focused on this fraction has indicated the prevalence of triterpenic glycosides on its leaves and green fruits<sup>14,16-18</sup>. Recently, saponin accumulation in mate green fruits was confirmed by LC-assay, and saponin contents as high as about 30 wt% were found in green fruits lyophilized extract<sup>19,20</sup>. Previous studies on the saponin-enriched fraction obtained from mate fruits have revealed a low haemolytic activity and negligible *in vitro* cytotoxicity against mammalian cell culture lines from<sup>21,22</sup> which comprise the main drawbacks on saponins biological application. The main saponins occurring in *Ilex* fruits are depicted on Figure 1<sup>14</sup>. To our knowledge however, no physico-chemical studies has been reported to date. A prerequisite to any application of these naturally occurring surfactants in either pharmaceutical or technological application would require an understanding of their physico-chemical properties, in particular a characterisation of the aggregate structures formed in solutions. This work therefore aims at bringing some insight into the physico-chemical properties of micelles from a saponin-enriched fraction (MSF) extracted from *Ilex paraguariensis* fruits, focusing on CMC determination, micellar size and shape, its rheological behaviour as well as its applicability for the solubilisation of poorly water soluble drugs.



	R1	R2	R3	R4
1	$\alpha$ -L-Ara1 $\rightarrow$	CH <sub>2</sub> OH	HO	H
2	$\alpha$ -L-Ara1 $\rightarrow$	CH <sub>3</sub>	HO	$\beta$ -D-Glc1 $\rightarrow$
3	$\beta$ -D-Glc1 $\rightarrow$ 3 $\alpha$ -L-Ara1 $\rightarrow$	CH <sub>3</sub>	HO	$\beta$ -D-Glc1 $\rightarrow$

Figure 1. General structure of the saponins of mate fruits here represented by mateside (1), zyhu-glycoside I (2) and ilexoside II (3). Based on Taketa, 2004.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Materials

Mate green fruits harvested from a selected cultivar in January 2008 were kindly supplied by Ervateira Barão (Barão de Cotegipe, RS, Brazil). A voucher specimen was deposited at the Federal University of Rio Grande do Sul Herbarium under the code ICN 125105 (Porto Alegre, Brazil). The dye 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol was purchased from Fluka Chemika (Switzerland). Diaion HP-20 was from Mitsubishi (Japan). Formvar-carbon and hexagonal thin bar grids were from Koch (Germany) and Agar Scientific Ltd (England), respectively. Saponin enriched fraction from *Quillaja saponaria* (S-4521) was from Sigma (USA). Cellulose acetate membrane filters were obtained from Millipore, Ireland. All compounds were used as received.

## **2.2 Methods**

### **2.2.1 Saponin enriched fraction (MSF)**

Green fruits were manually separated from leaves and stalks, dried at 35 °C for 72 h in a forced ventilation oven (Memmert, Germany) and milled using a cutter mill (Retsch SK1, Germany). The plant powder (2.1 mm) was firstly macerated with a 40% ethanol solution (10% w/v) during 40 min and afterwards extracted by turbolysis (IKA T-25 basic, Germany) during 15 min, avoiding overheating. The extract was filtered and concentrated to one-half of its original volume under vacuum in a rotating evaporator (Büchi R114, Switzerland) and further lyophilized (Edwards, USA).

The saponin enriched fraction (MSF) was obtained from lyophilized extract by solid phase extraction within a Diaion HP-20 polyaromatic resin and a methanol:water gradient<sup>23,24</sup>. Saponins were recovered from the less polar fractions containing methanol 70 and 90% (v/v) after organic solvent elimination and further lyophilisation.

Since the presence of salts can strongly affect micellar features, the analysis of MSF micelles was carried out in the absence of buffers for pH-control. Natural pH was of  $5.17 \pm 0.13$ .

### **2.2.2 Critical Micelle Concentration (CMC)**

The determination of the CMC was based on a dye solubilisation technique, using the water-insoluble dye 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol, PAN, with modifications of the original method<sup>25</sup>. Briefly: 37.5 µL of a 1.6 mM PAN pentane solution was added to 200 µL MSF solutions at concentration ranging from  $1.53 \times 10^{-5}$  to 2% (w/v) and left to rest for 30 min. The mixture was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min and the supernatant transferred to a 96-well microplate. The absorbance was determined at 470 nm using a Spectra Max 190 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) and plotted against surfactant concentration. Below the CMC, the dye is insoluble and the absorbance is zero. As micellar aggregates start forming, the dye



becomes solubilised in the micelles and absorbance increases. The onset of solubilisation, i.e. the point where absorbance starts increasing, is taken as the CMC. The measurements were made in triplicates.

### **2.2.3 Transmission electron microscopy (TEM)**

10  $\mu\text{L}$  of a 0.6% (w/v) concentrated MSF solution were placed on formvar-carbon grids (200 Mesh) and contrasted with uranyl acetate (2% w/v) during 15 min. The analysis was performed on a Jeol Microscope JEM 1200 Ex II at an acceleration voltage of 80 kV and magnifications of 40.000 and 100.000  $\times$ .

### **2.2.4 Cryo-TEM**

Approximately 3  $\mu\text{l}$  of 4% (w/v) MSF solution were placed on a 700 mesh hexagonal thin bar grid, blotted with filter paper, frozen by fast immersion in 'slushed' nitrogen ( $-210^\circ\text{C}$ ) and transferred to the specimen holder under liquid nitrogen. The samples were imaged with a Tecnai T20 microscope (FEI<sup>TM</sup>, Oregon, USA) at 200kV,  $-175^\circ\text{C}$  and a Gatan Ultrascan 2K camera (Pleasanton, USA).

### **2.2.5 Small Angle Neutron Scattering (SANS)**

SANS measurements on 0.5 and 1.0 % (w/v) MSF solutions were performed on LOQ beamline, at the ISIS facility (Didcot, U.K). The instrument uses incident wavelengths  $\lambda$  from 2.2 to 10.0  $\text{\AA}$  sorted by time-of-flight with a fixed sample-detector distance of 4.1 m, which corresponds to scattering vectors  $Q = 4\pi/\lambda \sin(\theta/2)$  from 0.008 to 0.240  $\text{\AA}^{-1}$ , where  $\theta$  is the measured scattered angle. The solutions were placed in quartz cells with a 2.0 mm path length and the measurements were performed at a controlled temperature of  $25^\circ\text{C}$ . The raw scattering data were corrected for background scattering, empty cell scattering, detector efficiency, electronic noise and transmission

and converted to differential scattering cross-sections in absolute units of  $\text{cm}^{-1}$  using standard procedures at ISIS.

### 2.2.5.1 SANS data modelling

Initial data evaluation was performed using the Guinier analysis aiming to achieve an estimate of the average radius of gyration. Considering the low-Q data from dilutions of monodisperse particles <sup>26</sup>, the Guinier approximation is given by:

$$I(q) = I(0)\exp(-q^2 R_g^2 / 3) \quad (\text{Equation 1})$$

where  $I(0)$  is the coherent forward scattering intensity. By fitting the experimental data to Equation 1,  $R_g$  is assessed from the slope of the linear part of a  $\ln I(Q)$  vs  $Q^2$  plot, which is called a "Guinier plot". As a result of the assumption of a spherical shape the radius of gyration is given by:

$$R_g = \sqrt{\frac{3}{5}} R \quad (\text{Equation 2})$$

where  $R$  is the radius of a sphere.

The data modelling program FISH was used to fit the SANS data. FISH uses a standard iterative least-squares fitting method in which selected parameters of the chosen model can be refined to optimize the fit. Parameters are refined from several starting points to ensure that a global (rather than a local) minimum has been found. A pre-factor, referred to as the 'scale' factor, contains parameters such as volume fraction and contrast. The 'scale' parameter is left to float and then the value returned by the fit checked against its calculated value to confirm consistency of the fit.

Data were fitted using a model for polydisperse spheres, with a size distribution following the Schultz model:

$$P(r) = \left(\frac{z+1}{R}\right)^{z+1} r^z \exp\left(-\frac{z+1}{R} R\right) \frac{1}{\Gamma(z+1)} \quad (\text{Equation 3})$$

Where  $\bar{R}$  is the average value of  $R$ ,  $\Gamma(x)$  is the gamma function and  $z$  is a measure of the width of the distribution. The polydispersity index returned by the fit is given by  $\sigma / \bar{R}$  where  $\sigma$  is expressed by:

$$\sigma = \frac{\bar{R}}{\sqrt{z+1}} \quad (\text{Equation 4})$$

To account for the presence of large aggregates in the low-Q region, the spheres model was combined with a Porod-like term ( $A \times Q^N$ ). In order to estimate the fraction of material present in the spherical micelles, the scale obtained after fitting the data was compared with the theoretical ‘scale’ parameter calculated according to equation 5.

$$\text{‘scale’} = 10^{-24} \phi (\Delta\rho)^2 \quad (\text{Equation 5})$$

Where:  $\Delta\rho$  represents the scattering length density difference between the solute and the solvent ( $D_2O$ ) and  $\phi$  is the volume fraction of MSF.

The scattering length density of MSF ( $\rho_{MSF}$ ) was calculated by considering the molecular structure of ilexoside II, one of the main saponins found in mate fruits (Taketa, 2004) and the chemical marker of MSF:  $\rho_{MSF} = 0.86 \times 10^{10} \text{ cm}^{-2}$ .

## 2.2.6 Rheology

MSF solutions ranging in concentration from 0.25 to 4.0 % (w/v) were analysed using a controlled-strain ARES rheometer (TA instruments, Delaware, USA) coupled to a Julabo FP35 water bath (Seelbach, Germany). Dynamic strain and frequency sweep tests were carried out at 25°C using a 50 mm plate diameter and a 0.8 mm gap. After placing the solutions on the rheometer and lowering the upper plate, they were left to rest for 15 min before starting the measurements to allow complete recovery. For dynamic strain tests, the storage and loss modulus ( $G'$  and  $G''$ , respectively) were

measured at a frequency of 1Hz and strain varying between 0.05 to 100% in order to determine the linear viscoelastic region of the material. Dynamic frequency measurements were performed in the linear viscoelastic regime (taken as 50% of the maximum strain) determined from the dynamic strain experiments.

### **2.2.7 Micellar solubilisation**

An excess of carbamazepine or flurbiprofen (20 mg) were added separately to a set of aqueous saponin solutions with concentrations ranging from 0.13 to 1.5% (w/v) and stirred magnetically for 24 h at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . The samples were then left to rest for 30 min, prior to centrifugation for 30 min at 2.01 g and filtered through 0.45  $\mu\text{m}$ -cellulose acetate membrane filters to ensure the elimination of large particles. For each solution, measurements of pH and electrical conductivity were performed at  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  (pHmeter Digimed DM-22 Brazil, Quimis Q405M conductivitymeter, Brazil). The concentration of each dissolved drug was determined by UV spectrophotometry at 248 and 285 nm for flurbiprofen and carbamazepine, respectively <sup>27,28</sup>. The percentage of drug solubilised (w/v) was plotted against the concentration of surfactant in micellar form (i.e. subtracting the value of the CMC from the experimental concentration). From the slope, the amount of drug solubilised in the micelles (w/w) was obtained.

## **3. Results and Discussion**

### **3.1 Determination of the CMC**

Fig. 2 shows the results of the CMC determination using the dye-solubilisation experiment. The absorbance of MSF-PAN solutions at fixed PAN concentration and increasing MSF is shown as a function of MSF concentration, plotted in logarithmic scale. The values are average values of triplicate measurements; the error bars are about the size of the symbols and therefore are not shown for clarity. The point of absorbance increase corresponds to the onset of micellar formation. By this method,

the CMC was estimated at  $0.41 \pm 0.005$  g/L (ca. 0.04 wt%). A number of physico-chemical properties of surfactant solutions change once they start aggregating into micelles, and these alterations are used to determine the value of the CMC. For comparison, the CMC of Quillaja saponin enriched fractions obtained from surface tension measurements gave a CMC of 0.13 g/L for a highly purified fraction (S-4521) while a lower grade fraction gave a CMC of 0.51 g/L for surface tension measurements and 0.56 g/L using the dye solubilisation technique<sup>7,8</sup>. A CMC of 0.339 g/L was obtained for a commercially available mixture of saponins from *Panax notoginseng* saponins<sup>11</sup>. CMC from both mixtures of Quillaja and *Panax notoginseng* are of the same order as the CMC found in our fraction from mate *Ilex paraguariensis*. For isolated saponins obtained from soya, the CMC values determined using the Wilhemy plate methodology were between 0.56 to 3.2 g/L<sup>12</sup>.

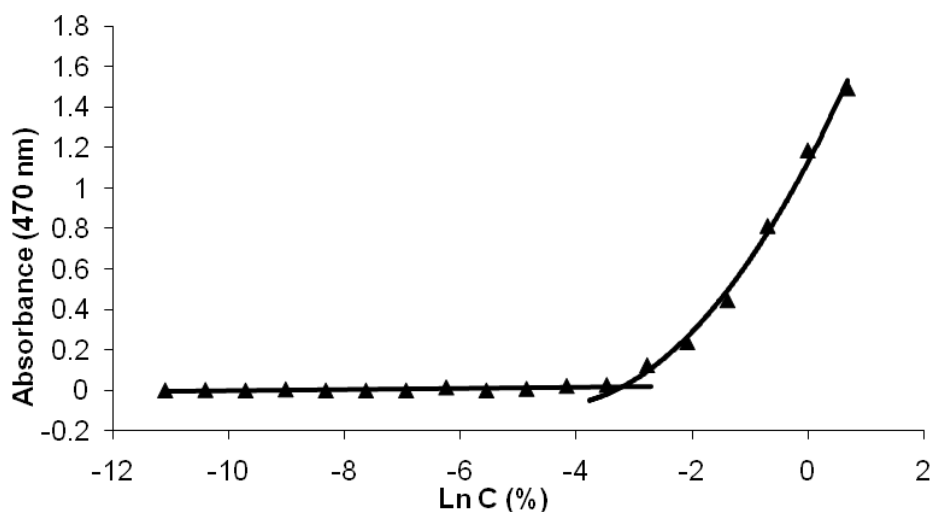


Figure 2. Absorbance of MSF-PAN solutions at fixed (7.5  $\mu$ M) PAN concentration and increasing MSF ( $1.53 \times 10^{-5}$  to 2%).

### 3.2 Transmission Electron Microscopy

TEM photomicrographs of MSF micelles (Fig. 3A and 3B) revealed the presence of elongated micelles of length higher than 500 nm. Cryo-TEM was used to confirm this finding; Cryo-TEM is considered to be a more accurate representation of the sample as by circumventing the use of staining, it avoids the artefacts often associated

with the technique. Cryo-TEM images presented in Fig. 4 also confirmed the occurrence of elongated structures, reminiscent of wormlike micelles. Smaller particles are also visible, which may be attributed to small spherical micelles. There are very few published data on the characterization of saponin micelles and, to our knowledge; these are the first reported Cryo-TEM pictures on elongated saponin aggregates. The occurrence of small size micelles (< 25 nm of diameter) for saponins of *Quillaja* has been demonstrated by TEM<sup>29</sup> and larger structures such as wormlike micelles have only been observed upon the addition of other components such as cholesterol and phospholipids<sup>30-32</sup>.

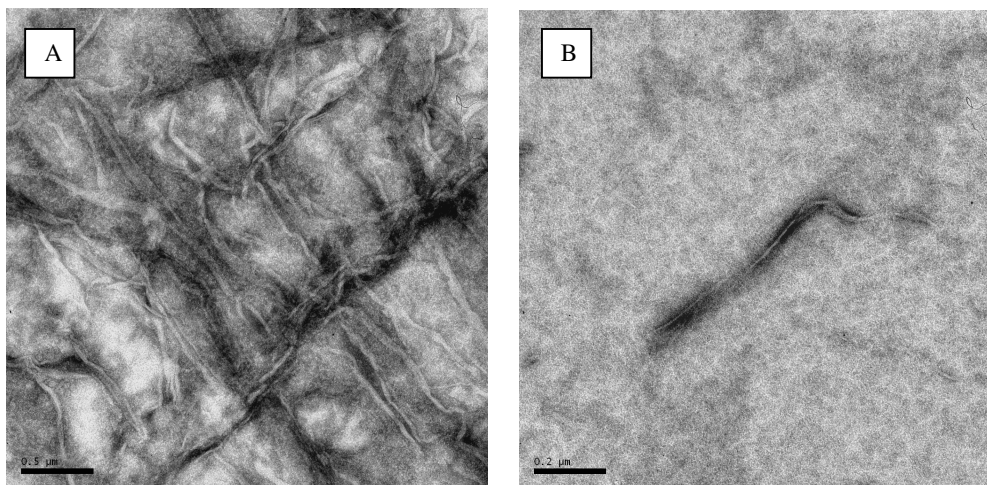


Figure 3. TEM photomicrographs of MSF solution at 0.6% (w/v): A) Magnification x 40,000 (scale bar 500 nm); B) Magnification x100,000 (scale bar 200 nm).

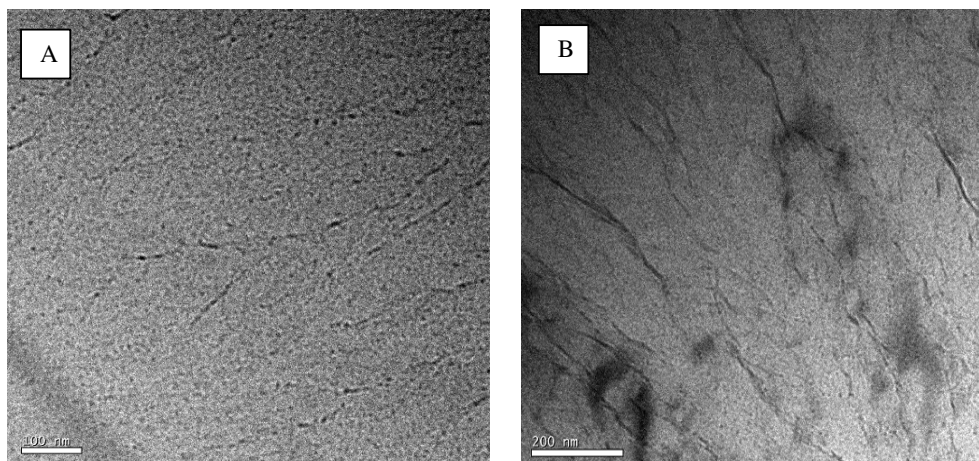


Figure 4. Cryo-TEM images of MSF solution at 4% (w/v): A) Magnification  $\times 25,000$  (scale bar 100 nm); B) Magnification  $\times 19,000$  (scale bar 200 nm)

### 3.3 Small angle neutron scattering

The structure of saponin aggregates was further investigated by SANS. Fig. 5 shows the scattering curves obtained from solutions of MSF of 0.5 and 1.0% (w/v) and the corresponding Guinier plots. The concentrations were chosen as being low enough to avoid inter-particle interactions in the analysis of the data and high enough to optimize signal-to noise ratio. The absence of a structure factor was indeed confirmed by normalisation of the curves by the volume fraction and verifying that they superimposed (not shown).

Two distinct regions can be distinguished from the scattering behaviour: at low- $Q$ , the scattering increases following approximately a  $Q^{-2}$  behaviour; above this region (from  $Q \sim 0.025 \text{ \AA}^{-1}$ ), a plateau is found, followed by a decrease in intensity and typical Porod-like behaviour ( $Q^{-4}$ ) at high  $Q$ . A Guinier analysis performed in the mid- $Q$  region ( $0.025\text{-}0.085 \text{ \AA}^{-1}$ ) gave a very good linear fit (Fig. 6, inset), leading to a radius of gyration of  $17 \text{ \AA}$  at both concentrations. Assuming spheres, this gives a radius of  $22 \text{ \AA}$ . The scattering in this region could be fitted by a simple sphere model, while the steeper increase in intensity in the lower- $Q$  (below ca.  $0.025 \text{ \AA}^{-1}$ ) was attributed to the scattering from larger aggregates, of which the full length is outside the measurable  $Q$  range. A model to fit the full  $Q$ -range was constructed by adding a

Porod term,  $A \times Q^N$ , to the scattering of small spheres.  $N$  was found to be  $\sim -3.6$  and the radius of small spherical scattering objects in the mid-to-high  $Q$  region was  $17.9 \pm 0.8 \text{ \AA}$  at both concentrations, with a polydispersity  $\sigma/\bar{R} = 0.2$ . These are likely to be saponin micelles, formed by one or several of the species in the saponin mixture. This size is comparable to the size of micelles found in Quillaja-enriched fraction, namely around  $30 \text{ \AA}$  radius<sup>8</sup>. The ‘scale’ parameter (Equation 4) returned by the fit and proportional to the volume fraction (see Materials and Methods) is obviously lower than the expected one as the material included in the larger aggregates is not accounted for. Comparing both fitted and experimental values gives an estimate of the volume fraction of material included in the spherical micelles. Values of  $23.1 \pm$  and  $32.6 \pm 1.0 \%$  were obtained for 0.5 and 1.0% concentrations, respectively, showing that only a small fraction of MSF aggregates as spherical micelles. The presence of larger scattering objects in the low  $Q$  region concurs with the findings from the TEM and Cryo-TEM images showing elongated aggregates. These results seem to indicate that a fraction of saponins self-assemble into spherical micelles, while some of the species present in the mixture aggregates into wormlike micelles.



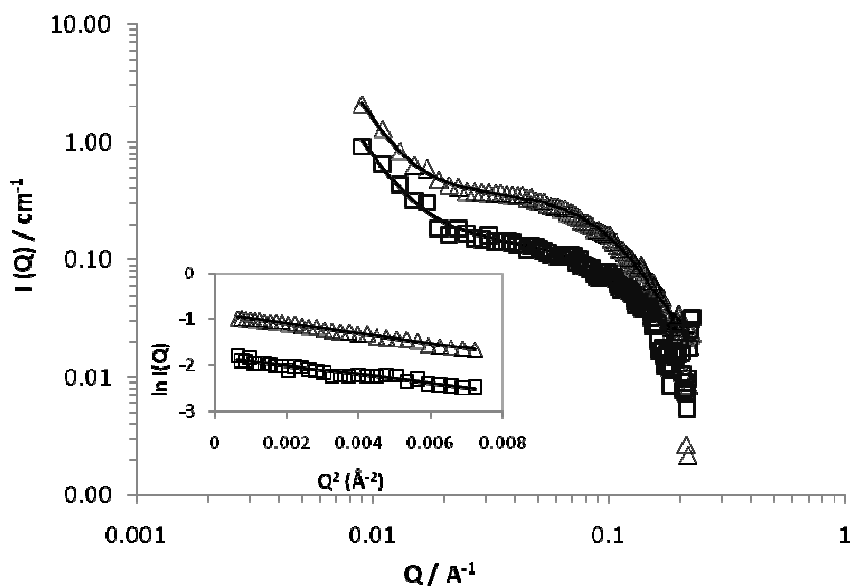


Figure 5. Small-angle scattering data obtained from MSF solutions at 0.5% (squares) and 1.0% (triangles): raw and fitted SANS data where the solid lines are best fits to the curves, using the model described in the text. Both axes are presented in log scale. Insert: Guinier plot

### 3.4 Rheology measurements

Fig. 6 shows the elastic ( $G'$ ) and viscous ( $G''$ ) modulus of MSF solutions as a function of strain (%) for two concentrations of MSF, namely, 0.25 and 4 w/v %. Both present similar profiles with a linear viscoelastic region below 1.6% strain, mostly independent of the concentration. This profile suggests the occurrence of weakly self-assembled structures, with  $G'$  well above  $G''$  in this region.

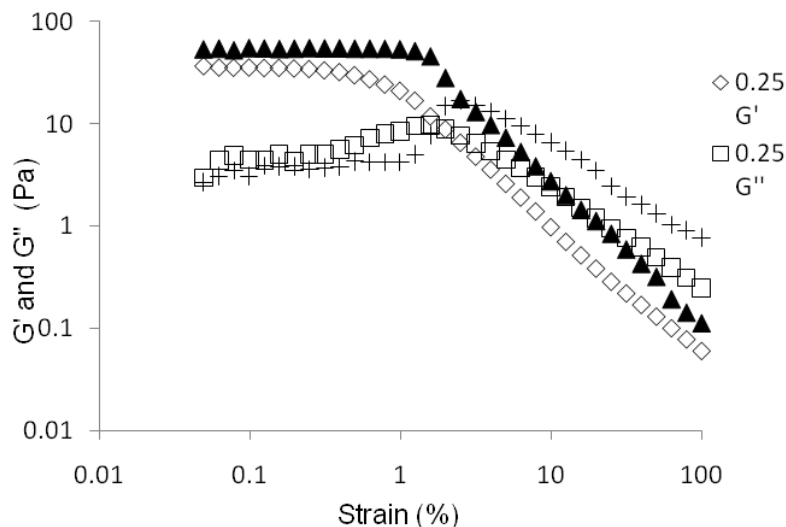


Figure 6. Dynamic strain sweep measurements of MSF solutions at 0.25 and 4.00 % (w/v), with strain varying from 0.05 to 100% at 1 Hz and 25°C.

Fig. 7 shows dynamic frequency sweep measurements of MSF solutions ranging in concentration from 0.25 to 4.00 w/v%.

The data show the occurrence of viscoelastic behaviour, with  $G' > G''$  over the whole range of frequencies measured and the existence of slow relaxation processes (the longest relaxation time,  $\tau_{\max}$ , which is the cross-over between  $G'$  and  $G''$  is  $\tau_{\max} > 10^2$  s). The behaviour is reminiscent of the  $G'$  plateau in the rubbery region of concentrated polymer solutions, with a very slight increase in  $G'$  with frequency and decrease of  $G''$  towards a minimum, with  $G'/G'' \sim 15$  at the minimum. Although the values of the storage modulus are relatively weak ( $G' \sim 60$  Pa), this visco-elastic behaviour could not occur in a solution of small spherical micelles and can only be explained by the presence of large interacting aggregates or entanglements of elongated structures on some length scale. Therefore, this is a strong indication that long and flexible aggregate structures are present, which also concurs with the findings from TEM and Cryo-TEM. Surprisingly however, we note that the elasticity does not increase much with concentration, suggesting that the structures do not significantly grow in size within the range of concentration evaluated.

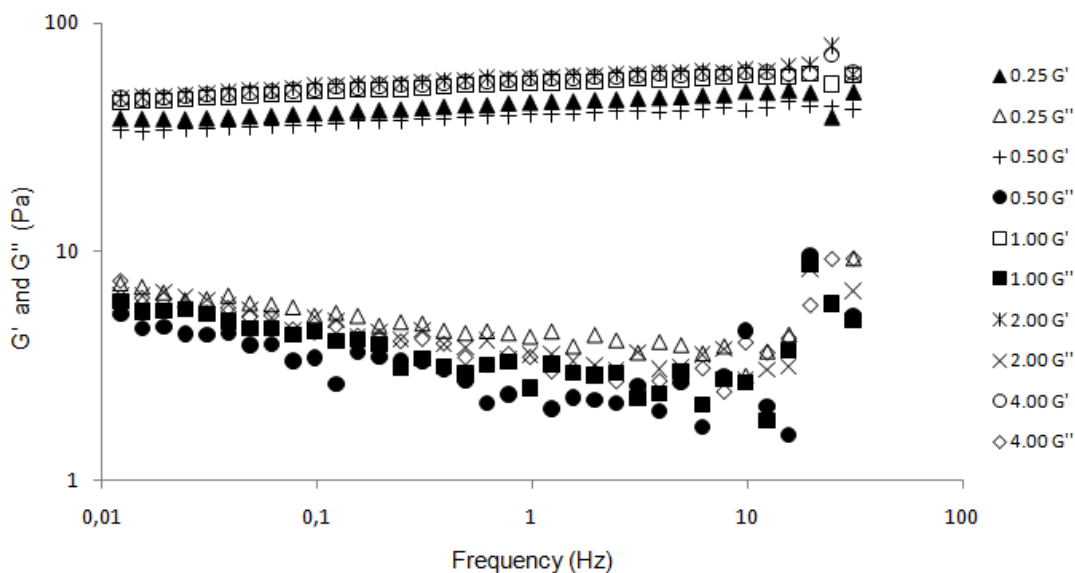


Figure 7. Dynamic frequency sweep measurements of MSF solutions ranging in concentration from 0.25 to 4.00 w/v% at 25°C.

### 3.5 Micellar Solubilisation

Solubilisation by means of surfactants micelles is a well-known method to enhance the bioavailability of poorly soluble drugs. The use of non-toxic and non-irritating saponins seems to be an interesting alternative to more commonly used surfactants and some reports can be found on the solubilisation of hydrophobic compounds in saponins<sup>6,33-35</sup>. In this work, carbamazepine and flurbiprofen were selected as weak basic and weak acidic drug models, respectively, and the solubilisation ability of MSF was compared to saponins from Quilaja. Both drugs have been the subject of extensive studies to date<sup>36-41</sup> and their physical and chemical properties are therefore well established.

Considering that pH can influence the solubility of ionizable compounds, pH measurements were undertaken for each saponin solution in the absence of drug. Conductivity was also analyzed as a descriptive parameter (Table 1).

Table 1. Conductivity and pH values for MSF and Quillaja in the absence of model drugs.

[Surfactant] in relation to CMC	pH	Conductivity ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )
Quillaja 10	4.91	63.7
50	4.72	148.7
100	4.74	241
MSF 10	5.29	33.5
50	5.19	127.3
100	5.04	239

According to Table 1, all pH values are reasonably similar (RSD < 5%), which allowed the comparison of the solubilisation effect of surfactants in the absence of buffers. The conductivity of MSF reveals the presence of at least one ionic saponin, since conductivity values increase significantly while pH decreases smoothly. The values obtained are equivalent to those obtained from Quillaja, in which glucuronic acid is one of the components<sup>42</sup>.

The values of pKa of flurbiprofen and carbamazepine are 4.22<sup>43</sup> and 13.9<sup>44</sup> respectively. Flurbiprofen is just slightly ionized and carbamazepine is ionized at the analysis conditions. The solubilisation profile for both Quillaja and MSF is presented on Fig. 8. From the curves is clear that the solubilisation of carbamazepine is higher than flurbiprofen, which is probably influenced by the pH of both saponin fractions in aqueous solutions. Curves linear regression as well as its determination coefficients are demonstrated in Table 2.

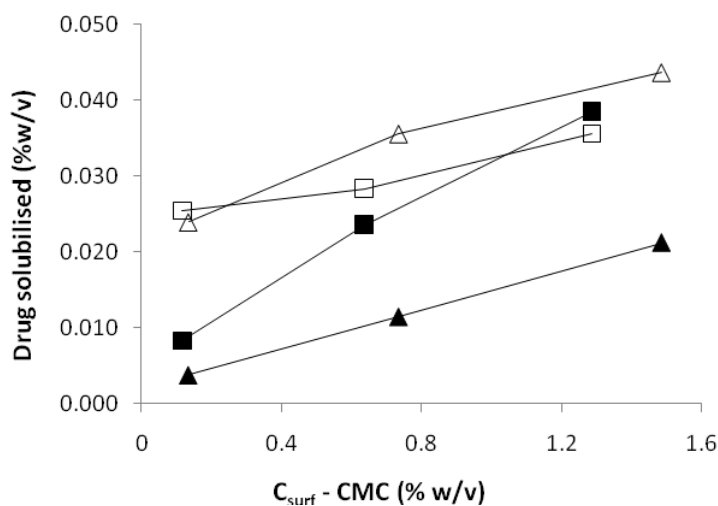


Figure 8. Micellar solubilisation of carbamazepine (open symbol) and flurbiprofen (filled symbols) using MSF (triangles) and Quillaja (squares).

Table 2. Linear regressions and determination coefficients for the solubilisation of model drugs using MSF and Quillaja varying from 0.13 to 1.5 % (w/v)

	Carbamazepine	Flurbiprofen
Quillaja	$y = 0.0088x + 0.0238$ ( $R^2$ 0.9675)	$y = 0.0257 x + 0.006$ ( $R^2$ 0.9949)
MSF	$y = 0.0145x + 0.0231$ ( $R^2$ 0.9719)	$y = 0.0129x + 0.002$ ( $R^2$ 0.9999)

Considering that the intercept is correlated with the drug solubility in the absence of surfactants, it can be concluded that results of both saponin mixtures were comparable and the slightly difference of pH from both solutions didn't affect strongly the drug solubilisation. From the slope, it is possible to obtain the percentage of drug solubilised on micelles (w/w), and it can be observed that Quillaja and MSF possess different performances toward the drugs. MSF was able to improve carbamazepine solubility in a higher amount while Quillaja was more effective toward flurbiprofen. This demonstrates the influence of both chemical composition and micelles shape on the proposed application.

For comparison, the amount of carbamazepine solubilised at a 1% MSF solution was of 1.54 mM which was comparable to the improvement obtained using an aqueous solution of pluronic micelles in the absence of pH control<sup>45</sup>. The performance of both mixtures toward flurbiprofen was lower than the increase in the solubility obtained with the use of Tween 20 at pH 5.4, which showed a molar solubilisation capacity of 0.32<sup>43</sup>, nevertheless they cannot be considered negligible.

#### **4. Conclusions**

The work presented here present for the first time quantitative physico-chemical data on *Ilex paraguariensis* saponins. A combination of TEM, Cryo-TEM and small-angle neutron scattering measurements concurred to show that the saponins mixture formed both small spherical micelles of ~18 Å radius and elongated micellar aggregates, reminiscent of wormlike micelles, at a critical micellar concentration of 0.41 g/L. The presence of elongated structures gave the saponins solutions a viscoelastic behaviour, with low dependency on solution concentration (up to 4 wt%). Saponin micelles demonstrated different abilities toward the solubilisation of model drugs with MSF being successfully used to improve the aqueous solubility of the weak basic drug, which make them promising materials for such application.

## **Acknowledgments**

The authors are grateful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support. The ARES rheometer used in this study was funded by EPSRC as part of research grant EP/F037902/1. ISIS is acknowledged for the provision of neutron beam time.

## References

1. Schramm LL, Stasiuk EN, Marangoni DG 2003. Surfactants and their applications. *Annual Reports on the Progress of Chemistry - Section C* 99:3-48.
2. Sun HX, Xie Y, Ye YP 2009. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine* 27(12):1787-1796.
3. Güçlü-Ustundag O, Mazza G 2007. Saponins: Properties, applications and processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 47(3):231-258.
4. Vincken JP, Heng L, de Groot A, Gruppen H 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68(3):275-297.
5. Pillion DJ, Amsden JA, Kensil CR, Recchia J 1996. Structure-function relationship among Quillaja saponins serving as excipients for nasal and ocular delivery of insulin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85(5):518-524.
6. Mitra S, Dungan SR 2001. Cholesterol solubilization in aqueous micellar solutions of quillaja saponin, bile salts, or nonionic surfactants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(1):384-394.
7. Mitra S, Dungan SR 1997. Micellar Properties of Quillaja Saponin. 1. Effects of Temperature, Salt, and pH on Solution Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(5):1587-1595.
8. Mitra S, Dungan SR 2000. Micellar properties of quillaja saponin. 2. Effect of solubilized cholesterol on solution properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 17(2):117-133.
9. Wang ZW, Gu MY, Li GZ 2005. Surface properties of Gleditsia saponin and synergisms of its binary system. *Journal of Dispersion Science and Technology* 26(3):341-347.
10. Balakrishnan S, Varughese S, Deshpande AP 2006. Micellar characterisation of saponin from *Sopindus mukorossi*. *Tenside, Surfactants, Detergents* 43(5):262-268.
11. Xiong J, Guo J, Huang L, Meng B, Ping Q 2008. Self-micelle formation and the incorporation of lipid in the formulation affect the intestinal absorption of Panax notoginseng. *International Journal of Pharmaceutics* 360(1-2):191-196.
12. Decroos K, Vincken JP, van Koningsveld GA, Gruppen H, Verstraete W 2006. Preparative chromatographic purification and surfactant properties of individual soyasaponins from soy hypocotyls. *Food Chemistry* 101(1):324-333.
13. Heck CI, Mejia EG 2007. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science* 72(9):138-151.



14. Taketa ATC, Breitmaier E, Schenkel EP 2004. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Mate). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 15(2):205-211.
15. Schubert A, Pereira DF, Zanin FF, Alves SH, Beck RCR, Athayde ML 2007. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Pharmazie* 62(11):876-880.
16. Gosmann G. 1989. Porto Alegre: Saponinas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (erva-mate) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 108. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
17. Kraemer KH, Taketa ATC, Schenkel EP, Gosmann G, Guillaume D 1996. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. *Phytochemistry* 42(4):1119-1122.
18. Martinet A, Ndjoko K, Terreaux C, Marston A, Hostettmann K, Schutz Y 2001. NMR and LC-MSn characterisation of two minor saponins from *Ilex paraguariensis*. *Phytochemical Analysis* 12(1):48-52.
19. Pavei C, Guzatto P, Ros Petrovick P, Gosmann G, González-Ortega G 2007. Development and validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (mate) fruits. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 30(1):87-95.
20. Gnoatto SCB, Schenkel EP, Bassani VL 2005. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 16(4):723-726.
21. Peixoto MPGP, Canto GS, Holz CL, Resende PE, Treter J, Roehe P, Ortega GG. 2008. Hemolysis and skin irritancy evaluation of *Ilex paraguariensis* A. St-Hil. saponins XII Congreso de La Federación Farmacéutica Sudamericana, Montevideo.
22. Treter J, Peixoto MPG, Giordani RB, Kaiser S, Tasca T, Ortega GG. 2009. Atividade tricomonocida de saponinas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Mate). Congresso Internacional em Saúde da Universidade e III CISDEM (Cátedra Iberoamericano-Suíza de Desarrollo de Medicamentos), Maringá.
23. Koike K, Jia Z, Nikaido T 2001. New triterpenoid saponins from *Maesa tenera*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 49(6):758-761.
24. Pavei C. 2004. Porto Alegre: Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. . Universidade Federal do Rio grande do Sul. 134. Master Thesis.

25. Furton KG, Norelus A 1993. Determining the critical micelle concentration of aqueous surfactant solutions: Using a novel colorimetric method. *Journal of Chemical Education* 70(3):254-257.
26. Kratky O 1963. X-ray small angle scattering with substances of biological interest in diluted solutions. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 13(C):105-173,IN101.
27. Sajeev C, Jadhav PR, RaviShankar D, Saha RN 2002. Determination of flurbiprofen in pharmaceutical formulations by UV spectrophotometry and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 463(2):207-217.
28. Rane Y, Mashru R, Sankalia M, Sankalia J 2007. Effect of hydrophilic swellable polymers on dissolution enhancement of carbamazepine solid dispersions studied using response surface methodology. *AAPS PharmSciTech* 8(2).
29. Demana PH, Davies NM, Vosgerau U, Rades T 2004. Pseudo-ternary phase diagrams of aqueous mixtures of Quil A, cholesterol and phospholipid prepared by the lipid-film hydration method. *International Journal of Pharmaceutics* 270(1-2):229-239.
30. Demana PH, Davies NM, Hook S, Rades T 2005. Quil A-lipid powder formulations releasing ISCOMs and related colloidal structures upon hydration. *Journal of Controlled Release* 103(1):45-59.
31. Pham HL, Shaw PN, Davies NM 2006. Preparation of immuno-stimulating complexes (ISCOMs) by ether injection. *International Journal of Pharmaceutics* 310(1-2):196-202.
32. Myschik J, Lendemans DG, McBurney WT, Demana PH, Hook S, Rades T 2006. On the preparation, microscopic investigation and application of ISCOMs. *Micron* 37(8):724-734.
33. Schopke T, Bartlakowski J 1997. Effects of saponins on the water solubility of quercetin. *Pharmazie* 52(3):232-234.
34. Song S, Zhu L, Zhou W 2008. Simultaneous removal of phenanthrene and cadmium from contaminated soils by saponin, a plant-derived biosurfactant. *Environmental Pollution* 156(3):1368-1370.
35. Urum K, Pekdemir T 2004. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere* 57(9):1139-1150.
36. Park KM, Kim CK 1999. Preparation and evaluation of flurbiprofen-loaded microemulsion for parenteral delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 181(2):173-179.
37. Muraoka A, Tokumura T, Machida Y 2004. Evaluation of the bioavailability of flurbiprofen and its  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex in four different doses upon oral

administration to rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 58(3):667-671.

38. Li P, Zhao L 2003. Solubilization of flurbiprofen in pH-surfactant solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92(5):951-956.

39. Javadzadeh Y, Jafari-Navimipour B, Nokhodchi A 2007. Liquisolid technique for dissolution rate enhancement of a high dose water-insoluble drug (carbamazepine). *International Journal of Pharmaceutics* 341(1-2):26-34.

40. Kogan A, Aserin A, Garti N 2007. Improved solubilization of carbamazepine and structural transitions in nonionic microemulsions upon aqueous phase dilution. *Journal of Colloid and Interface Science* 315(2):637-647.

41. Savolainen M, Kogermann K, Heinz A, Aaltonen J, Peltonen L, Strachan C, Yliruusi J 2009. Better understanding of dissolution behaviour of amorphous drugs by in situ solid-state analysis using Raman spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71(1):71-79.

42. Soltysik S, Wu JY, Recchia J, Wheeler DA, Newman MJ, Coughlin RT, Kensil CR 1995. Structure/function studies of QS-21 adjuvant: Assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. *Vaccine* 13(15):1403-1410.

43. Saveyn P, Cocquyt E, Zhu W, Sinnaeve D, Haustraete K, Martins JC, Van Der Meeren P 2009. Solubilization of flurbiprofen within non-ionic Tween 20 surfactant micelles: A <sup>19</sup>F and <sup>1</sup>H NMR study. *Physical Chemistry Chemical Physics* 11(26):5462-5468.

44. Queiroz RHC, Bertucci C, Malfará WR, Dreossi SAC, Chaves AR, Valério DAR, Queiroz MEC 2008. Quantification of carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, phenytoin and phenobarbital in plasma samples by stir bar-sorptive extraction and liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48(2):428-434.

45. Kadam Y, Yerramilli U, Bahadur A 2009. Solubilization of poorly water-soluble drug carbamazepine in Pluronic micelles: Effect of molecular characteristics, temperature and added salt on the solubilizing capacity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 72(1):141-147.

## **CAPÍTULO 5**

### **DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÃO**

---

O desenvolvimento e qualificação de um processo tecnológico de fracionamento de substâncias a partir de materiais vegetais requerem um adequado monitoramento do processo.

Pavei (2007) propôs um método analítico por CLAE-UV isocrático, com foco na quantificação das saponinas mais polares dos frutos do mate, utilizando como padrão externo a matessaponina-3, uma saponina isolada das folhas de mate. Diferentemente desse, o método ora proposto visou abranger também a fração de saponinas menos polares, utilizando ilexosídeo II como referência, saponina anteriormente isolada a partir dos frutos de mate. O método foi validado para o extrato bruto liofilizado e posteriormente aplicado à fração saponosídica enriquecida, o que possibilitou o controle mais amplo do processo de purificação. A capacidade do método de detectar saponinas com uma ampla faixa de polaridade foi confirmada mediante a análise de substâncias-referência obtidas a partir de outras espécies do gênero *Ilex*, com padrões de substituição e polaridade distintos, incluindo saponinas mono e bidesmosídicas. O teor de saponinas determinado para os frutos verdes de mate confirmou relatos anteriores acerca da riqueza destes como fontes de saponinas, alcançando valores próximos a 7,30 g% em relação ao peso seco do fruto. Por sua vez, a abordagem utilizada para a obtenção da fração saponosídica enriquecida (MSF), adaptada de Pavei (2004), permitiu um alto rendimento em relação ao extrato bruto liofilizado (43,6 g%). A análise comparativa por CLAE-UV do extrato bruto liofilizado de MSF indica que o processo é capaz de eliminar de modo eficiente polifenóis e metilxantinas, compostos caracterizados pelo seu menor tempo de eluição e absorção característica acima de 215 nm. Este fato, já anteriormente relatado por Pavei (2004), foi confirmado mediante análise por CLAE-MS, uma vez que as substâncias detectadas na fração apresentaram massas moleculares de 950 a 1600 Da, coerentes com o previsto para saponinas já relatadas para mate. Adicionalmente, ao se comparar ponderalmente o rendimento da fração saponosídica em relação ao extrato liofilizado (43,6 g%) com o teor de saponinas totais estimado pelo método analítico (47,6 g%), notam-se valores bastante semelhantes, os quais denotam que o método de fracionamento possibilitou a recuperação quase completa das saponinas presentes no extrato liofilizado.

De modo geral, o potencial hemolítico e citotóxico das saponinas é uma das principais limitações à sua aplicação biológica. Sendo o volume de informações relativas aos frutos bastante restrito, a fração saponosídica de mate foi avaliada quanto ao seu potencial hemolítico e citotóxico, ambos em modelos *in vitro*. O efeito citotóxico de MSF foi avaliado utilizando linhagem de células de rim bovino MDBK, um ensaio que indica a toxicidade via quantificação da atividade mitocondrial das células após exposição à substância teste. O efeito da fração de saponinas de mate foi comparado com uma fração enriquecida de *Quillaja saponaria* e com os tensoativos não-iônicos tiloxapol e polissorbato 80. Com isso, mais do que uma comparação guiada por parâmetros químicos, levou-se em consideração a natureza anfifílica das substâncias testadas. O efeito citotóxico de MSF foi observado somente na maior concentração ensaiada (5,0 g/L), tendo sido inferior à observada para os tensoativos sintéticos, enquanto que a fração saponosídica de quillaia mostrou ser citotóxica em todas as concentrações ensaiadas (0,05 a 5,0 g/L). O valor de IC<sub>50</sub> para MSF pôde ser estimado em 3,8 g/L ou 4,10 mM, se expresso em ilexosídeo II. Comparativamente, os valores de IC<sub>50</sub> de citotoxicidade sobre linhagem não-tumorais de fibroblastos, relatados para algumas saponinas naturais e sintéticas derivadas do ácido oleanólico, variaram de 6 a 60 µM (Gauthier *et al.*, 2009).

Quanto à propriedade de hemólise, a ausência dessa atividade foi previamente relatada para extratos das folhas do mate (Gosmann, 1989). Contudo, essa constatação não é aplicável para o caso dos frutos, considerando a diferença de composição química entre as frações saponosídicas de frutos e folhas de mate relatada por Taketa (2004a). O valor de IC<sub>50</sub> de MSF foi estimado em 0,25 g/L ou 2,5 mM, se expresso em ilexosídeo II. Em comparação, saponinas de quillaia apresentam IC<sub>50</sub> de 0,0125 g/L ou 0,0077 mM, se expresso pelo valor médio de massa molecular relatada para esse produto (Mitra; Dungan, 2001).

Os resultados obtidos para os testes de citotoxicidade e hemólise indicam claramente uma baixa toxicidade para MSF, o que representa uma potencial vantagem para seu uso, quer seja em ensaios biológicos ou desenvolvimento de produto à base de saponinas de mate.

A capacidade de algumas saponinas de potencializar a resposta imune como adjuvantes em vacinas tem sido, possivelmente, a propriedade biológica mais avaliada, principalmente no caso das saponinas de quillaia. As primeiras evidências foram relatadas na década de 30, quando se demonstrou a atividade significativa de uma mistura de saponinas obtidas dessa espécie. Na década de 80, esta atividade começou a ser melhor caracterizada, sendo comprovada a capacidade de estimular tanto a imunidade humoral quanto a celular. Desde então outras espécies têm sido avaliadas sob a forma de mistura ou substância isolada. O fato de as saponinas serem capazes de estimular uma resposta celular, o que muitas vezes não ocorre no caso do hidróxido de alumínio, adjuvante aprovado para uso humano, fez com que o interesse pelas saponinas fosse ampliado. No presente trabalho, o modelo experimental selecionado emprega herpesvírus bovino como antígeno, o qual foi anteriormente utilizado para o ensaio de saponinas de *Q. brasiliensis* (Fleck *et al.*, 2006). O modelo se mostrou adequado em função dos resultados obtidos para os controles positivos Quil-A e hidróxido de alumínio, porém o efeito de MSF não foi significativo estatisticamente.

Diversas atividades biológicas das saponinas decorrem da sua capacidade de interagir com membranas biológicas. Nesse sentido sua atividade tem sido avaliada frente a diversos patógenos como vírus, protozoários, fungos e moluscos (Francis *et al.*, 2002). As saponinas de mate foram ensaiadas quanto à sua atividade tricomonocida, considerando a existência de um relato prévio para as saponinas de *Sapindus mukorossi* (Tiwari *et al.*, 2008). A avaliação comparativa com outras substâncias tensoativas teve como base o caráter anfifílico e a atividade potencial sobre interfaces orgânicas. Mais ainda, MSF foi testada na forma de pré-tratamento e co-administração com o fármaco de referência metronidazol, na tentativa de observar indicativos de seu mecanismo de ação e ampliar conhecimentos relativos à sua interação com membranas biológicas. MSF apresentou um efeito concentração-dependente, com letalidade total dos trofozoítos na concentração de 0,60 g/L. Essa atividade foi superior ao efeito observado para os tensoativos sintéticos, testados em concentrações superiores à concentração micelar crítica. Comparativamente à atividade relatada para as saponinas de *Sapindus mukorossi*, MSF apresentou, contudo, um efeito inferior. Para as saponinas de *S. mukorossi* foi observado efeito ainda abaixo

da sua concentração micelar crítica, sendo sugerido um mecanismo de ação baseado na atividade sobre o citoesqueleto das tricomonas. No caso de MSF, a atividade aparece apenas após a formação das micelas.

Ainda que a concentração efetiva seja superior à observada para *Sapindus*, esta concentração não gerou toxicidade sobre o modelo de células de rim bovino e, portanto, provavelmente não inviabilizaria a sua aplicação. Tanto o pré-tratamento quanto a co-administração de MSF e metronidazol não geraram um incremento de atividade. Isto demonstra que as saponinas não favoreceram a penetração celular do fármaco e que, adicionalmente, não houve interação entre o fármaco e MSF.

A terceira etapa do trabalho objetivou um aprofundamento no estudo físico-químico das saponinas enquanto substâncias anfifílicas, dando continuidade aos achados preliminares relatados por Canto (2007).

As aplicações das saponinas no âmbito químico-farmacêutico, tanto industrial quanto em nível de pesquisa, dependem primeiramente de uma ampla caracterização química e físico-química. O uso de tensoativos como agentes espumantes, solubilizantes de fármacos hidrofóbicos, promotores de permeação, agentes emulsionantes, entre outros, tem por princípio fundamental as propriedades de interface e a formação de micelas, o que também se aplica às saponinas. Nesse sentido, esta etapa do trabalho teve por enfoque a caracterização das micelas quanto a forma e tamanho, seu comportamento reológico em solução, assim como na capacidade solubilizante via micelar, utilizando duas substâncias modelo. Os dados referentes à sua atividade de superfície foram incorporados ao trabalho sob a forma de anexo (Ver anexo I).

Embora MSF seja composta por uma mistura de saponinas com ligeiras variações estruturais, a CMC apresentou uma faixa de valores restrita e bem definida em torno de 0,40 g/L. A análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrou micelas de tamanho superior a 500 nm, valor este, superior ao relatado inicialmente por Canto (2007). Igualmente, foi possível constatar a ocorrência predominante de micelas de forma filiforme, similar à observada em micelas



tipicamente *worm-like*. Este fato havia sido relatado para saponinas apenas quando associadas a outras substâncias como colesterol, e no caso de tensoativos sintéticos após adição de sais e co-tensoativos. No caso das saponinas de mate, estas estruturas se formam de maneira espontânea, em uma ampla faixa de concentração.

Entretanto, a análise por MET, ainda que forneça fortes indicativos do padrão estrutural de MSF, apresenta a desvantagem de necessitar da adição de agentes de contraste e da ocorrência de perda de água na amostra durante seu preparo e análise. Tais fatos podem gerar: I) aparecimento de artefatos; II) transição de forma em função da diminuição do conteúdo aquoso. Com a finalidade de confirmar os dados anteriores, foram feitas novas análises por crio-microscopia eletrônica de transmissão (CRIO-MET). Essa técnica traz como vantagens o fato de dispensar o uso de agentes de contraste e de que a amostra é previamente congelada, sendo mantida, portanto, em condições mais próximas do seu estado em solução. Assim, o padrão estrutural diferenciado de MSF foi igualmente detectado por CRIO-MET. Simultaneamente, foram observadas algumas micelas esféricas de tamanho reduzido.

A análise pela técnica de espalhamento de nêutrons constatou a ocorrência simultânea de micelas de tamanho elevado e de micelas esféricas de tamanho reduzido, sendo estas últimas da ordem de 18 Å, correspondendo a cerca de 20 e 30% da composição total de micelas, para as concentrações de 0,5 e 1,0 % (m/v) de MSF, respectivamente.

Uma vez que o tipo de comportamento reológico é influenciado pela forma das moléculas ou partículas, foi realizada a análise por reologia dinâmica com controle de deformação. Observou-se que a diminuição implícita na parcela de micelas filiformes não gerou qualquer modificação detectável no perfil reológico das soluções, as quais demonstraram comportamento viscoelástico invariável em todas as concentrações avaliadas (0,25 a 4,0 % m/v), com módulo elástico ( $G'$ ) bastante superior ao módulo viscoso ( $G''$ ). Tal observação também confirma a presença de agregados não-esféricos, já que micelas esféricas não geram a estruturação necessária ao aparecimento de comportamento elástico.

Para todas as concentrações de MSF foi observado o mesmo valor de  $G'$ , ou seja, as interações estabelecidas pelas micelas filiformes parecem não variar com a concentração. O mesmo parece acontecer em relação ao comprimento das micelas. Tal fato pode estar relacionado ao aumento do número das mesmas em detrimento da transição de forma. Os valores de  $G'$  e  $G''$  não sofrem alteração em função da frequência, para todas as concentrações, caracterizando um tempo longo de relaxação superior a 100s. Considerando que o tempo longo de relaxação está associado à ruptura e reorganização das micelas, este valor denota que em sua região de viscoelasticidade linear, que ocorre a baixos valores de deformação, as micelas de mate apresentam significativa estabilidade.

A observação de características inalteradas após manuseios diferentes, em testes diferentes, também sugere a ocorrência de micelas saponosídicas termodinamicamente estáveis, um fato a ser esclarecido ainda.

A aparente robustez desses agregados micelares pode estar associada ao desempenho não tão satisfatório observado nos ensaios biológicos, que seriam favorecidos pela desestruturação das micelas e, conseqüentemente, pela atividade das saponinas como entes individuais. No caso da atividade imunoadjuvante, o alto valor de tamanho das micelas também pode ter contribuído para o resultado observado.

Finalmente, as saponinas foram avaliadas como agente solubilizante, uma propriedade associada à capacidade de formação de micelas. Para isso, foram utilizados os fármacos flurbiprofeno e carbamazepina, ambas substâncias modelo pouco solúveis. A fração saponosídica de quillaia foi empregada como produto saponosídico de comparação.

A análise de condutividade demonstrou que tanto MSF como quillaia apresentam ácidos carboxílicos em sua estrutura, no entanto, o desempenho de ambos em relação à capacidade de solubilização foi oposto. Quillaia foi mais eficiente frente ao flurbiprofeno, um ácido fraco, enquanto MSF foi mais efetiva frente à carbamazepina, uma base fraca. Isso demonstra a influência da composição e forma micelar sobre a aplicação proposta e reflete, ainda, uma maior dificuldade na predição

do comportamento de misturas de saponinas. No entanto, como vantagem, os tensoativos de origem natural apresentam maior grau de biocompatibilidade e biodegradabilidade.

## Conclusões

- ✓ Um método analítico foi adequadamente desenvolvido e validado para o extrato bruto de mate, utilizando ilexosídeo II como marcador químico, visando estimar o conteúdo total de saponinas e o monitoramento do processo de fracionamento-enriquecimento de uma fração saponosídica;
- ✓ O processo de obtenção da fração saponosídica de mate (MSF) mostrou-se reprodutível e de elevado rendimento;
- ✓ Todas as substâncias detectáveis em MSF mostraram comportamento cromatográfico por CLAE e massas moleculares características de saponinas;
- ✓ Os valores de  $IC_{50}$  obtidos em testes de hemólise e citotoxicidade frente a culturas de células de mamíferos indicam um produto de baixa toxicidade;
- ✓ A avaliação biológica da fração apontou uma fraca atividade imunoadjuvante e moderada atividade tricomonocida;
- ✓ A caracterização físico-química do produto MSF indica fortemente a ocorrência, inédita até onde se saiba, de micelas filiformes, com tamanho da ordem de 500 nm, com elevado grau de organização, associadas a uma parcela menor de micelas esféricas de aproximadamente 20 Å;
- ✓ As estruturas filiformes relatadas pela primeira vez para saponinas, se formam de maneira espontânea, diferindo das estruturas similares, tipo *wormlike*, relatadas para tensoativos sintéticos, as quais, em geral, requerem a adição de sais e co-tensoativos para sua formação;
- ✓ A capacidade solubilizante dessas micelas foi evidenciada para a base fraca carbamazepina, porém mostrou-se menos eficaz para o ácido fraco flurbiprofeno;

Esse conjunto de dados abre, certamente, novas possibilidades para o potencial uso das saponinas de mate como adjuvante e carreador de interesse na área farmacêutica.

***ANEXOS***

*ANEXO 1 Caracterização da droga vegetal e obtenção da solução  
extrativa*

---

## **1. CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL**

### **1.1 Secagem e moagem da droga vegetal**

Os frutos verdes foram separados manualmente dos galhos e secos em estufa de ar circulante à temperatura de  $40 \pm 3^\circ\text{C}$  por 72 horas. Após a secagem, os frutos foram submetidos a moagem, em moinho de facas desprovido de malha.

### **1.2 Determinação da perda por dessecação (Farmacopéia Brasileira, 1988)**

Cerca de 1 g de material vegetal seco e moído foi acondicionado em pesa-filtro e deixado à temperatura de  $105 \pm 2^\circ\text{C}$  em estufa por 2 horas. Após resfriada em dessecador durante 30 minutos a amostra foi pesada e novamente mantida em estufa, sendo este procedimento realizado até a obtenção de peso constante. Os resultados foram expressos como teor de umidade residual, em porcentagem, pela média de três determinações.

### **1.3 Análise granulométrica (Farmacopéia Brasileira, 1988)**

Cerca de 25 g de frutos secos e moídos foram submetidos a tamisação em tamisador automático por 15 minutos sob 60 vibrações/min. Foram selecionados tamises com abertura nominal de malha de 2,83; 1,4; 1,0 e 0,425 mm. As frações retidas nos tamises e no coletor foram pesadas e os dados analisados pelo método gráfico. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

## **2. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATIVA**

### **2.1 Obtenção da solução extrativa**

Uma solução hidroalcoólica a 40% (v/v) foi adicionada à droga vegetal na proporção droga-solvente de 1:10 e deixada em maceração estática por 40 min, sob

proteção da luz. A amostra foi submetida a turbólise, em Ultra-turrax, a 11.000 rpm por 15 min, a temperatura ambiente, sendo este período dividido em 3 etapas, com intervalos de 3 min entre elas. A solução extrativa foi centrifugada a 2.01 g por 30 min e filtrada sob pressão reduzida utilizando papel de filtro comum. Para caracterização da solução extrativa, foi retomado o volume inicial adicionando-se álcool a 40%. Em seguida, a fração orgânica foi eliminada em evaporador rotatório ( $55 \pm 3$  °C) e a fração aquosa, congelada em freezer ( $-10$  °C) e posteriormente liofilizada por 72 h.

## **2.2 Caracterização da solução extrativa**

### **2.2.1 Determinação do resíduo seco (Farmacopéia Brasileira, 1977)**

Uma amostra de 20,0 g da solução extrativa foi pesada em pesa-filtro e concentrada em banho de água, a 90 °C, até resíduo. Em seguida, o pesa-filtro foi mantido à temperatura de  $105 \pm 3$  °C em estufa, durante 2 horas. Após este período, foi resfriado em dessecador por 30 minutos e pesado. Este procedimento foi repetido até peso constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de resíduo seco (% m/m), pela média de três determinações.

### **2.2.2 Determinação do pH (Farmacopéia Brasileira, 1988)**

O pH da solução extrativa foi determinado em potenciômetro à 25 °C, previamente calibrado. O resultado foi expresso pela média de três determinações.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Obtenção e caracterização da droga vegetal**

A verificação de autenticidade e a caracterização da droga vegetal é a etapa inicial no desenvolvimento de qualquer produto oriundo de uma matéria-prima



vegetal. A padronização de todas as etapas concernentes ao processamento do material vegetal é imprescindível para estabelecer parâmetros de qualidade e obter reprodutibilidade em lotes de produção distintos (Alberton et al., 2001).

O teor de umidade está diretamente relacionado à conservação da droga vegetal. O valor obtido foi de 7,08% o qual pode ser considerado bastante satisfatório, dado que o teor máximo de umidade estabelecido varia entre 8 e 14% nas diferentes farmacopéias (Farias, 2003).

A granulometria do material vegetal pode influenciar o rendimento da etapa de extração. Os dados referentes aos frutos de mate secos e moídos encontram-se na Figura 1.

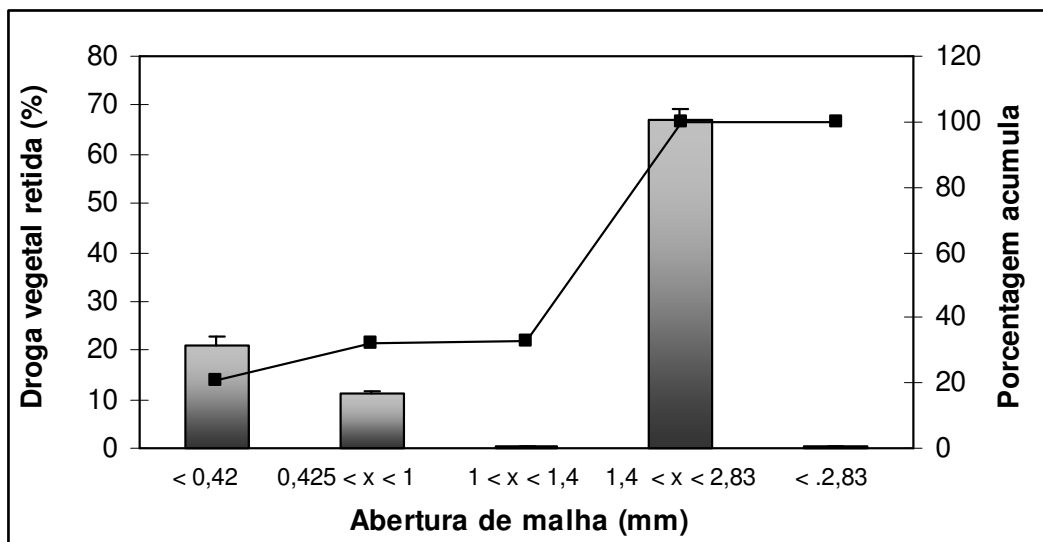


Figura 1: Distribuição granulométrica da droga vegetal: barras – porcentagem retida; linhas – porcentagem acumulada

A maior parte do material encontra-se na faixa de 1,4 a 2,83 mm. O pó obtido pode ser considerado grosseiro, no entanto, considerando a alta taxa de cisalhamento do método de extração empregado, esse valor de tamanho de partícula, provavelmente não interfere de maneira negativa sobre o processo extrativo.

### **3.2 Caracterização da solução extrativa**

O pH da solução extrativa e o teor sólidos solúveis foram de  $5,18 \pm 0,2$  e  $1,53\% \pm 0,02$  (m/v), respectivamente. O valor de pH está de acordo com o obtido em trabalhos anteriores (PAVEI, 2004; CANTO, 2007). O valor do teor de sólidos encontra-se ligeiramente abaixo do anteriormente obtido, no entanto, embora, o método de extração adotado tenha sido o mesmo, tratam-se de materiais obtidos em épocas de coleta distintas, o que poderia justificar a variação encontrada.

## Referências

Alberton, J. R., et al. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* L. Skeels). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n.1, p.37-51. 2001.

Canto, G. S. **Avaliação físico-química e tecnológica da fração saponosídica dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. : potencialidade como adjuvante espumógeno**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. 215 p. Tese (Doutorado em Farmácia).

Farias, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: Simões, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003, p.263-288.

Farmacopéia Brasileira, 3ª Ed. São Paulo: Andrei. 1977.

\_\_\_\_\_. 4ª Ed. São Paulo: Ateneu. 1988.

Pavei, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004. 134 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

*ANEXO 2 Perfil de tensão superficial da fração de saponinas  
enriquecida*

---

O perfil de tensão superficial foi determinado pelo método do anel de Le Comte DuNöuy (Nima Technology DST 9005, Inglaterra), com uma velocidade de imersão do anel de 5mm/min, a  $25 \pm 3$  °C (Figura 1). As soluções foram preparadas na faixa de concentração de 0,006 a 2,7 mM utilizando água deionizada (condutividade de 2,8  $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ , Milli-Q, Millipore, EUA). As concentrações molares de MSF foram expressas em ilexosídeo II (MM 929,029). Os valores de concentração de excesso de superfície ( $\Gamma$ ,  $\text{mol}/\text{m}^2$ ) e área por molécula na interface ( $A$ ,  $\text{\AA}^2$ ) foram calculados de acordo com as equações 1 e 2, respectivamente (Tabela 1). O valor de abaixamento máximo da tensão superficial na concentração micelar crítica ( $\pi_{\text{CMC}}$ ) foi determinado graficamente a partir da Figura 1.

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \times \frac{d\gamma}{dc} \quad (\text{equação 1})$$

$$A = 1/(\Gamma \times N_{AV}) \quad (\text{equação 2})$$

Sendo: **R** a constante universal dos gases ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ); **T** temperatura absoluta (K);  $\gamma$  tensão superficial ( $\text{mNm}^{-1}$ ); **c** concentração de saponinas ( $\text{mol L}^{-1}$ );  $N_{AV}$  constante de Avogadro ( $6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ).

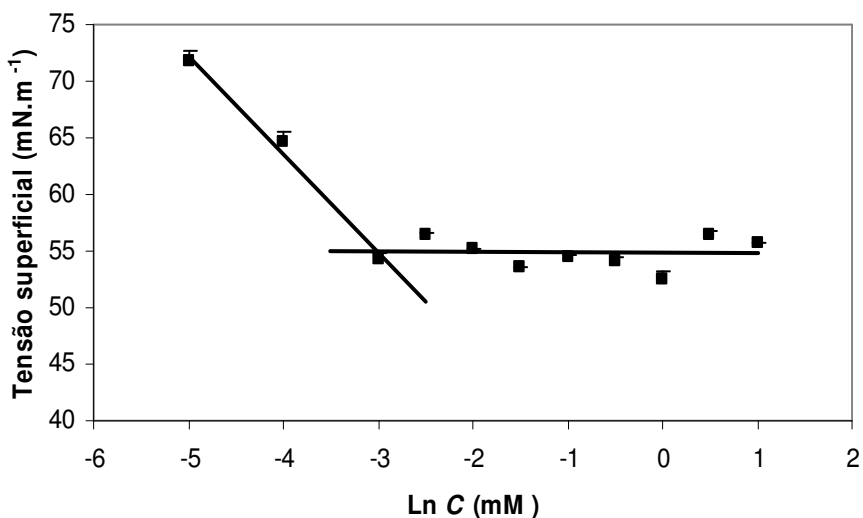


Figura 1. Perfil de tensão superficial de MSF na faixa de concentração de 0,006 a 2,7 mM (expresso em ilexosídeo II)

Tabela 1. Pressão de superfície na CMC ( $\pi_{\text{CMC}}$ ), concentração superficial de excesso ( $\Gamma$ ) e área por molécula na interface ( $A$ ).

$\pi_{\text{CMC}}$ (mN m <sup>-1</sup> )	$\Gamma$ (mol.m <sup>-2</sup> )	$A$ (Å <sup>2</sup> )
52,8	3,5 x 10 <sup>-6</sup>	47,45

Esses dados foram preteridos do texto principal devido à imprecisão observada quando o método do anel se aplica à determinação de tensão superficial. A ruptura da camada molecular superficial da fase líquida durante a determinação da tensão superficial, assim como o efeito da massa molecular do tensoativo determinam uma cinética mais lenta de reorganização na interface. Dessa maneira, os dados aqui inseridos representam medidas aproximadas e indicativas das características de superfície das saponinas de mate.

*ANEXO 3 Determinação dos módulos viscoso e elástico a partir do  
ensaio de reologia dinâmica*

---

A técnica de reometria dinâmica permite a determinação das características elásticas e viscosas da dispersão coloidal de saponinas, através dos respectivos módulos  $G'$  e  $G''$ . Para isso, a amostra é submetida a uma deformação oscilatória, correlacionando-se com a tensão necessária para que essa deformação seja mantida (Radebaugh, 1996).

Ao se aplicar uma deformação senoidal em um material elástico ideal, os sinais de onda de tensão e deformação estarão em fase. Se a amostra possuir caráter de fluido ideal, a tensão estará defasada em  $90^\circ$  em relação à deformação. Para materiais viscoelásticos, o ângulo de defasagem ( $\delta$ ) entre tensão e deformação estará entre 0 e  $90^\circ$ . A relação entre os módulos  $G'$  e  $G''$  é expressa pelo módulo complexo  $G^*$  (Eq. 1), o qual representa a energia total necessária para a deformação do material.

$$G^* = G' + iG'' \quad \text{(Equação 1)}$$

Sendo  $G'$  o módulo elástico,  $G''$  o módulo viscoso e  $i$ , matematicamente igual a  $\sqrt{-1}$ , uma ferramenta utilizada para manter separados os componentes em fase e fora de fase. O módulo também é dado pela relação entre as variáveis complexas de tensão e deformação ( $\sigma^*/\gamma^*$ ). Onde:

$$\sigma^* = \sigma_0^{i(\omega t + \delta)} \quad \text{(Equação 2)}$$

$$\gamma^* = \gamma_0^{i\omega t} \dots \dots \dots \text{.....(Equação 3)}$$

Sendo:  $\sigma_0$ , a magnitude máxima da tensão;  $\gamma_0$  a magnitude máxima da deformação;  $\omega$  a frequência angular;  $t$  representa o tempo e  $i = \sqrt{-1}$ .

Os módulos viscoso e elástico são derivados do módulo complexo de acordo com as equações 4 e 5.

$$G' = |G^*| \cos \delta \dots \dots \dots \text{(Equação 4)}$$

$$G'' = |G^*| \sin \delta \dots \dots \dots \text{(Equação 5)}$$



Experimentalmente, os sinais de onda de deformação e força são comparados à ondas referências de amplitudes fixas tendo ângulo de fase de 0 e 90° (Figura 1). Os dados são posteriormente transformados em vetores de onda relativos aos eixos referências de 0 e 90° (Figura 2).

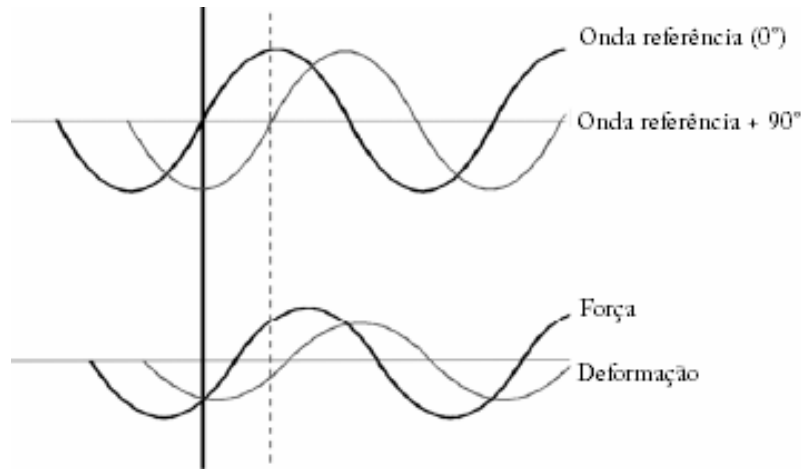


Figura 1. Comparação das ondas de força e deformação e sinais de onda referência (0° e 90°).

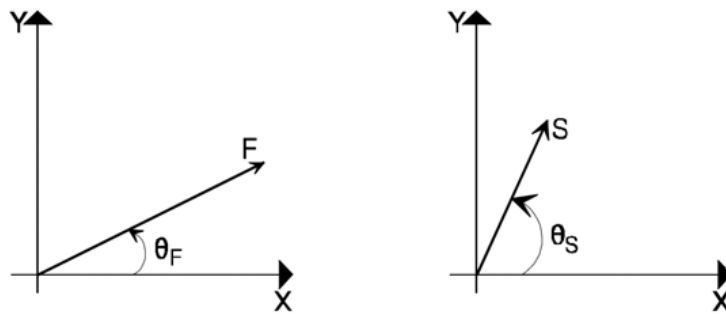


Figura 2. Relação entre os vetores de força e deformação com os vetores de onda de referência. Sendo: X: Vetor de referência, Y: Vetor de referência + 90°, F: Vetor de força, S: vetor de deformação,  $\theta_F$ : ângulo de defasagem força-referência,  $\theta_S$ : ângulo de defasagem deformação-referência.

Dessa maneira, a partir da transformação do vetor de deformação (S) em um novo vetor referência (Eixo X, Figura 3), é possível a determinação do ângulo de defasagem entre ambos ( $\theta$ ), eliminando os vetores de referência originais (Ares, 2006).

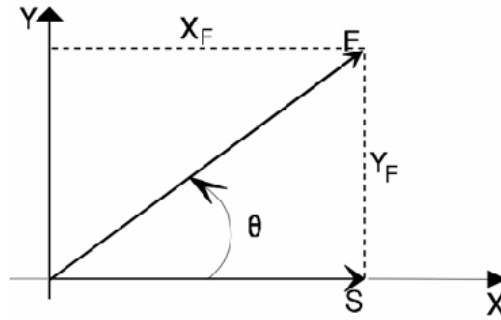


Figura 3. Transformação do vetor de deformação em vetor referência e determinação de  $\theta$ . Sendo: F: vetor de força, S: vetor de deformação,  $X_F$ : componente da força em fase com a deformação,  $Y_F$ : componente da força com  $90^\circ$  de defasagem, X: eixo de referência da deformação, Y: eixo de referência de deformação +  $90^\circ$ .

O vetor de força é transformado em tensão, sendo então calculado o valor de  $G^*$ . Os valores de  $G'$  e  $G''$  são obtidos de acordo com as equações 4 e 5.

As micelas apresentam valores de tempo de relaxação que também podem ser verificados por com seu comportamento reológico. O tempo longo de relaxação, que representa o tempo necessário para o rompimento e reconstituição das micelas é determinado pelo cruzamento entre os perfis de  $G'$  e  $G''$  ( $G'=G''$ ), quando os módulos são avaliados em função da frequência. Matematicamente este valor representa o tempo necessário para a energia elástica armazenada ser dissipada e fornece indicativo do tempo de vida ou estabilidade da micela. Micelas mais estáveis são as que apresentam maiores valores de tempo longo de relaxação.

## Referências

Ares rheometric series user manual, TA Instruments – Waters LLC, New Castle, 2006.

Radebaugh, G. W. Rheological and Mechanical Properties of Dispersed Systems. In: Lierberman H. A.; Rieger, M. M.; Banker, S. B. (Org.). **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 153-211.

*ANEXO 4 Parecer do Comitê de ética em Pesquisa*

---



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**  
**CARTA DE APROVAÇÃO**

pro.pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

**Número :** 2007782

**Título :** Estudo físico-químico, biológico e tecnológico de frações saponosídicas de *Ilex paraguriensis* A. St. Hil.

**Pesquisador (es) :**

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
GEORGE GONZALEZ ORTEGA	PESQ RESPONSÁVEL	ortega@farmacia.ufrgs.br	33085218
CABRAL PAVEI	PESQUISADOR	00117373@ufrgs.br	
MARIA PAULA GAROFO PEIXOTO	PESQUISADOR	peixoto_mpaula@yahoo.com.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 38 , ata nº 118 , de 13/11/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quinta-feira, 13 de novembro de 2008

  
ILMA SIMON BRUM DA SILVA

***ANEXO 5 Artigo: Avaliação da atividade imunoadjuvante da fração  
de saponinas enriquecida***

---

## SHORT COMMUNICATION

Investigation of immunoadjuvant activity of triterpenic saponins from *Ilex paraguariensis* and *Uncaria tomentosa* using a BoHV-5 viral vaccine

Maria P. G. Peixoto <sup>a</sup>, Cabral Pavei <sup>a</sup>, Samuel P. Cibulski <sup>b</sup>, Carine L. Holz <sup>c</sup>; Grace Gosmann <sup>a</sup>; Paulo M. Roehle <sup>b</sup>, George G. Ortega <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Fepagro Saúde Animal, Estrada Municipal do Conde, 6000, 92990-000, Eldorado do Sul, RS, Brazil

<sup>c</sup> CIRAD, Département Systèmes Biologiques, Campus International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

\* **Corresponding author:** [ortega@farmacia.ufrgs.br](mailto:ortega@farmacia.ufrgs.br); phone number: +55-51-3308-5278; fax number: +55-51-3308-5437.

## 1. Introduction

Vaccination remains a highly cost effective approach of both human and veterinary healthy strategies of controlling infectious diseases (Vordermeier *et al.*, 2005; Mutwiri, 2007). The first generation of antigens used to produce vaccines were mostly comprised of killed or live attenuated microorganisms (Shams, 2005). Although these antigens generated satisfactory results in many cases, their use also lead to some concerns as attenuated vaccines can recover virulence or cause disease in immunodepressed animals. While killed antigens are safer than the attenuated ones, they are generally less immunogenic and produce lower cell mediated responses (through Th1 cells and cytotoxic T lymphocytes) which is essential when dealing with intracellular pathogens such as virus.

New generations of antigens, such as recombinant proteins and DNA vaccines, which were developed to overcome some disadvantages of the traditional antigens, also posses a weak immunogenicity and therefore requires the addition of adjuvants. Aluminum salts are the most used adjuvants, acting as both delivery systems and immune potentiators, nevertheless, their activity is mainly through a Th2 response (Daines *et al.*, 2009). In this regard, there is an increased search for new adjuvants which can produce a Th1 or a balanced Th1/Th2 response. Saponins are among the promising adjuvants for this purpose. They are naturally occurring amphiphilic substances comprised of a triterpenic or steroid core to which one or more sugar chains are attached (Francis *et al.*, 2002). The interest for this class of compounds started on the 30's decade when a saponin fraction obtained from the species *Quillaja saponaria* proved to enhance both humoral and cellular responses, however, they also showed an intrinsic toxicity that can lead to unwanted side effects (Oda *et al.*, 2000; Oliveira-Freitas *et al.*, 2006; Pickering *et al.*, 2006; Quenelle *et al.*, 2008). Compared to other saponins, Quillaja has a non-usual chemical structure which comprises an aldehyde group and acyl side chains attached to its hydrophobic triterpenic core. This pattern was initially thought to be responsible for saponins activity, nevertheless, over the years of research aiming to obtain less toxic Quillaja saponin fractions and establish its structure-activity relationship, this unusual pattern were no longer considered essential



for saponins immune response (Oda *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2009). Hence, it was further established that saponins adjuvant activity is likely to reside in a balance between its hydrophilic and hydrophobic functional groups, rather than each individual functional chemical group itself and several other species possessing less complex saponins structures, such as Soyasaponins and saponins from Platycodon and Polygala species, demonstrated significant results (Oda *et al.*, 2003; Song; Hu, 2009; Sun *et al.*, 2009).

In this regard, we selected two important saponin-related species, *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (mate), widely cultivated in South American countries possessing high contents of saponins with no previous studies as a vaccine adjuvant and *Uncaria tomentosa*, commonly known as “cat’s claw”, a native liana of the Amazonian forest where decoctions from its bark had been used traditionally as anti-inflammatory, anti-tumoral and immune stimulating (Heitzman *et al.*, 2005). Considering the relative lack of adjuvants that can exhibit potent Th1 responses toward intracellular pathogens, the species immunoadjuvant potential were tested using a bovine herpesvirus (BoHV-5) viral antigen as model.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Plant material**

Mate unripe fruits were harvested in January, 2006, in Barão de Cotegipe, Brazil, a credited cultivar of *Ilex paraguariensis* St. Hil. Barks of *Uncaria tomentosa* (batch 0107/06) were kindly provided by Laboratorios Induquímica S.A., Lima, Peru. The raw materials were identified and air-dried at 35°C during 72 h (Memmert, Germany).

## 2.2. Preparation of enriched fractions

The extractive solutions of *Ilex paraguariensis* or *Uncaria tomentosa* were prepared using a hydroethanolic solution (40%; v/v) and a drug:solvent ratio of 1.0:10 (w/w). The extracts were further lyophilized (Modulyo 4L, Edwards, USA) after removal of the organic phase. Aliquots of dried extracts (300 mg) were fractioned by a solid phase technique on a polystyrene macroporous resin (Diaion HP-20, Supelco, USA) by applying a methanol:water gradient in decreasing polarity. The enriched saponin fraction of mate (MSF) and cat's claw quinovic derivatives (UQT) were recovered from the less polar fractions containing methanol 70 and 90% (v/v). LC-analyses of both fractions were performed by separated methods previously validated and their purity and concentration assessed using Ilexoside II, previously isolated from *Ilex paraguariensis* fruits (Taketa *et al.*, 2004; Peixoto *et al.*, 2009 ) and alpha-hederin, selected as reference substance to expresses the total triterpenic derivatives in *Uncaria tomentosa* (Pavei *et al.*, 2009).

## 2.3. Animals

Male CF-1 of 6 weeks old were purchased from Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (Porto Alegre, Brazil), housed in polypropylene cages, acclimatized for 1 week prior to use and maintained at a temperature of  $22 \pm 3$  °C and a 12-h light-dark cycle. Feed and water were supplied *ad libitum*. All the experimental procedures were carried out in accordance to the Guide for the Use and Care of Laboratory Animals (1996) and were approved by the University Research Ethics Committee (Projects n° 2007782 and 2007793).

## 2.4. Vaccine and immunization

The bovine herpesvirus type 5 (BoHV-5 strain EVI 88) multiplication was performed on the Madin-Darby bovine kidney cell lineage (MDBK, ATCC CCL-22).

Cells were multiplied and maintained in Eagle's minimal essential medium (Gibco) supplemented with 10% foetal bovine serum (Soraly) and antibiotics (Penicillin-Streptomycin) in usual concentrations (Paul, 1970). Cells were incubated at 37 °C and maintained in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere whenever necessary.

For virus multiplication, MDBK cells were infected with a multiplicity of infection equal to 0.1, following usual methods (Roche *et al.*, 1997).

When typical herpesvirus cytopathic effect was evident in at least 90% of the monolayer, bottles were frozen at -70 °C, thawed, clarified by low speed centrifugation (1500 rpm) and the supernatant used as the experimental vaccine antigen. Virus titres were calculated according to usual methods (Mahy; Kangro, 1996) and expressed as the log<sub>10</sub> tissue culture infectious doses per 50 mL (TCID<sub>50</sub>/50 mL). The infectious virus titre of the antigen before inactivation was of 10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub>/50 µL.

Eight groups of six mice each were immunized subcutaneously twice, on days 0 and 14, with 100 µL of antigen added to 150 µL of saline containing individually: 100 or 500 µg of MSF (*Ilex paraguariensis* saponin enriched fraction) and UTQ (*Uncaria tomentosa* quinovic acids), 50 µg of Quil-A and 100 µg of aluminum hydroxide (Omega Química, Brazil).

Negative control groups were inoculated with antigen diluted in saline at the same proportion used for the vaccine preparation and with saline only. All experimental vaccines and negative controls were filtered through 0.22 µm membranes (Sartorius, Germany) with exception to aluminum which was autoclaved at 120 °C for 15 min prior to the mixture with the antigen to avoid salt retention on the membrane.

#### 2.4.1 Collection of serum samples

Blood was collected from mice on days 0, 14, 28 and 42 after the first inoculation. Total IgG was evaluated at all times while IgG1 and IgG2a were assayed

at the days 28 and 42. Total IgG as well as IgG1 and IgG2a titres were determined individually from sera through an indirect ELISA based on Fleck *et al.* (2006) with minor modifications. Briefly: 96 well ELISA plates were coated with 100  $\mu$ L of a BoHV-5 citrate buffer solution (pH 5) at a 1:100 dilution and left overnight at 4 °C. Plates were then blocked using a 1% (w/v) albumine solution in phosphate buffer saline (PBS) for 1h at 37 °C. After washing the plates with a 0.1% solution of polysorbate 20 in PBS, sera samples were diluted (1:50) in a solution of PBS containing albumin at 1%, added in duplicate to the coated plates and incubated for 1 h at 37 °C. Next, 100  $\mu$ L of an anti-mouse IgG or IgG1 or IgG2a peroxidase conjugate in a 1:10,000 dilution (DAKO, Denmark) was added to wells and incubated for 1 hour (37 °C). After plate washing, a mixture of 1,2 *ortho*-phenylenediamine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were added to each well and plates were then incubated for 15 min at 37 °C. The reaction was ended by adding 50  $\mu$ L/well of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) and optical densities (O.D.) were measured in an ELISA plate reader (Anthos 2020, England) at 492 nm. Data were expressed as the mean O.D. value of the samples minus the mean O.D. value of controls.

## **2.5. Statistical analysis**

Data were expressed as mean  $\pm$  standard error. Statistical significances were evaluated by ANOVA and Newman-Keuls post test using GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, USA). Differences in *p*-value of  $\leq 0.05$  were considered significant.

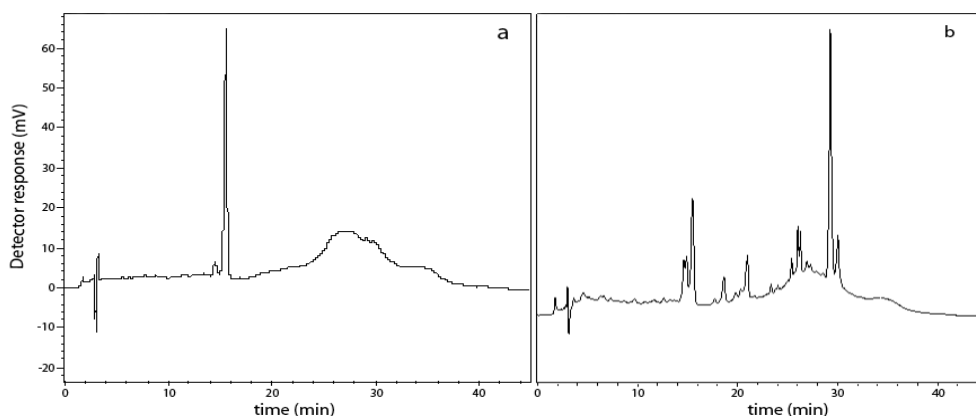
## **3. Results and Discussion**

Many infectious diseases, among them the bovine encephalitis caused by some herpesvirus such as BoHV-5 are mainly controlled by animals immunization (Souza *et al.*, 2009). Saponins and some other compounds from natural sources have been successfully evaluated as vaccine adjuvants, although their mechanism of action is not

completely established (Oda *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2007; Song; Hu, 2009). Propolis, a natural resinous material comprised of a mixture of several compounds such as polyphenols was successfully used as adjuvant in BoHV-5 oily vaccines (Fisher *et al.*, 2007).

Mate saponins are found in leaves and fruits of the specie *Ilex paraguariensis*. Higher saponins accumulation is found on fruits reaching contents as high as 30 wt% (Pavei *et al.*, 2007). Phytochemical work on mate demonstrates the occurrence of mono and bidesmosidic saponins derived mainly from ursolic and oleanolic acids (Gosmann *et al.*, 1989; Gosmann *et al.*, 1995; Taketa *et al.*, 2004). Ilexoside II, a bidesmosidic saponin previously reported for mate, is the major compound identified in MSF. The chemical profile of MSF and the occurrence of the chemical marker ilexoside II were previously analyzed using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) and to UV detection (LC-UV) (Peixoto *et al.*, 2009).

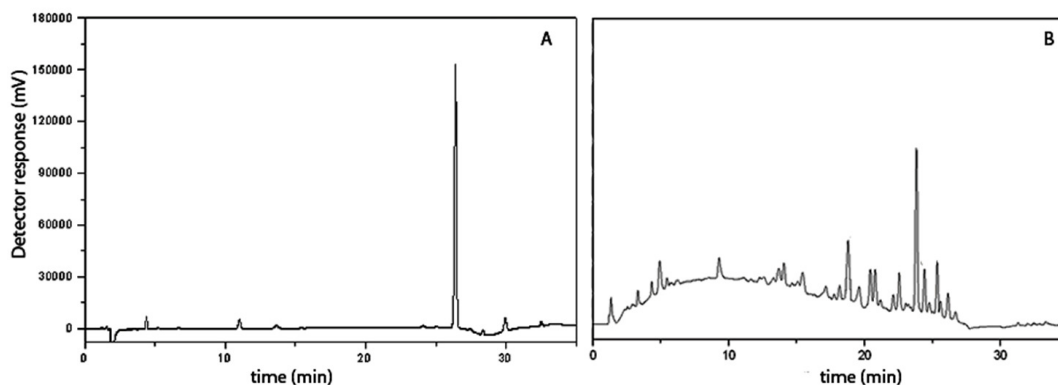
LC-UV profiles of MSF and ilexoside II are found in Fig. 1. Molecular weights compatible with saponins were demonstrated for all peaks occurring on MSF by means of LC-MS analysis (*data not shown*).



**Fig. 1.** Reverse phase LC-UV chromatograms of Ilexoside II at 0.5 mg/mL (A) and MSF at 1mg/mL (B). UV detection at 205 nm (No absorbance was detected on higher wavelengths).

Regarding, *Uncaria tomentosa*, the species is mainly used in the traditional medicine as immunostimulant, and this ethnopharmacological data is supported by solid scientific evidence (Wagner *et al.*, 1985; Lemaire *et al.*, 1999; Sandoval *et al.*, 2002). Certainly, the alkaloids fraction has been the main focus of the pharmacological and analytical efforts, notwithstanding, relevant therapeutic activities including anti-inflammatory and antiviral properties were also ascribed to the triterpenic fraction, specifically, to the quinovic acid derivatives (Aquino *et al.*, 1989; Aquino *et al.*, 1991).

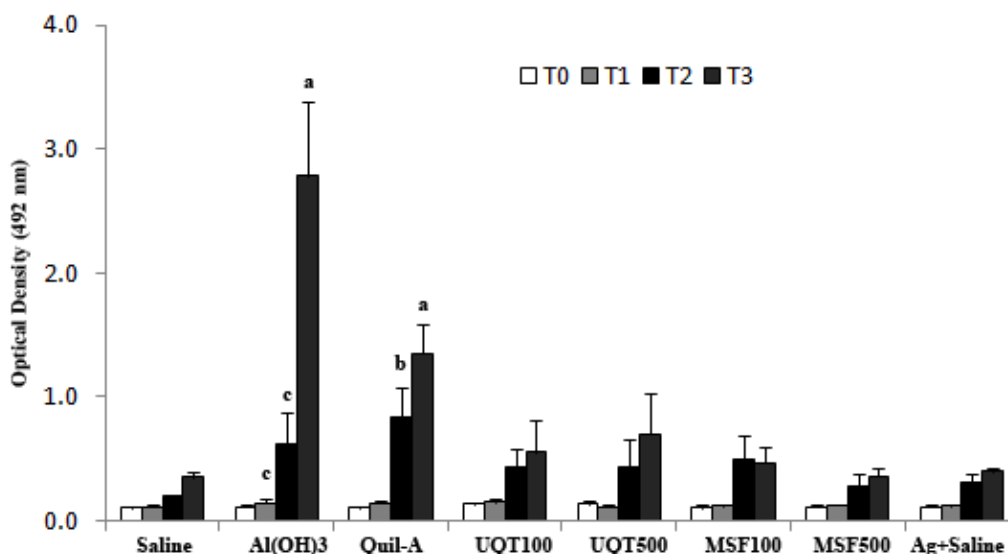
Fig. 2 shows the chromatographic profile of the alpha-hederin standard substance and the quinovic derivative fraction from *Uncaria tomentosa* after cleanup step.



**Fig. 2.** LC-UV chromatograms of alpha-hederin (A) and quinovic derivatives fraction (B). UV detection at 205 nm (No absorbance was detected on higher wavelengths).

Total saponin contents were determined as 7.30 wt% and 0.25 wt% for MSF and UQT, respectively (expressed as its chemical markers Ilexoside II and alpha-hederin).

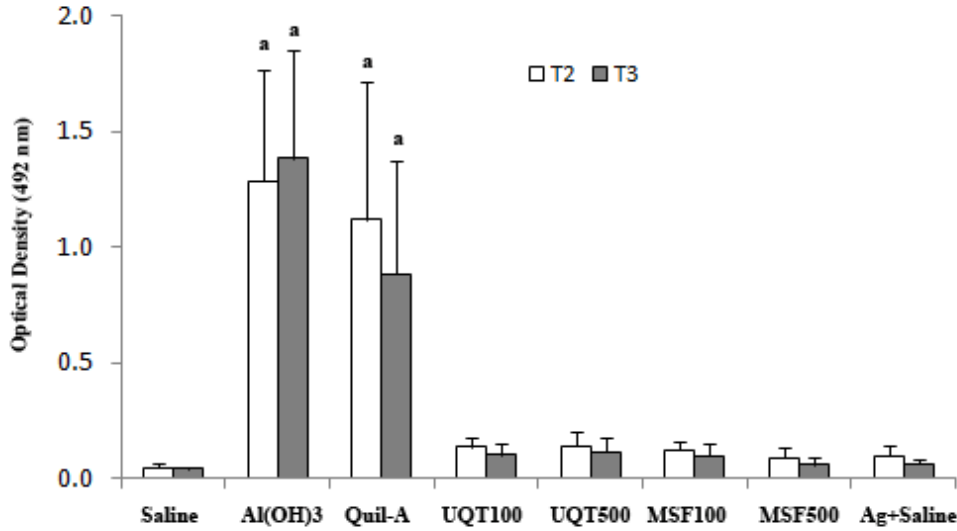
The total IgG titres after mice immunization with MSF and UQT are presented in Fig. 3.



**Fig. 3.** Total IgG antibody, represented as optical density at 492 nm using indirect ELISA. Mice were immunized on days 0 and 14 and sera were collected on days 0, 14, 28 and 42 (T0, T1, T2 and T3 respectively). Statistical significance:  $p < 0.001$  (a),  $p < 0.01$  (b),  $p < 0.05$  (c). Groups were compared with antigen added to saline.

Quil-A, a mixture of saponins obtained from the species *Quillaja saponaria*, has the ability to enhance both Th1 and Th2 immune responses and therefore, is generally considered a promising adjuvant for viral vaccines. Both Quil-A and aluminum hydroxide were able to enhance IgG titres. Fleck *et al.* (2006) evaluated the activity of a saponin enriched fraction obtained from the species *Quillaja brasiliensis* using a BoHV-1 as antigen and total IgG titres produced after the positive control Quil-A were comparable to the achieved herein. However, although still significant compared to controls groups, Quil-A titre had a lower increase compared to aluminum hydroxide after 42 days. This was previously observed for a vaccine using BoHV-1 where Quil-A total IgG level started to decrease after 112 days (84 days after boosting) (Fleck *et al.*, 2006). Conversely, aluminum hydroxide total IgG titres increased significantly from day 28 to day 42. Using hepatitis B antigen, 50  $\mu\text{g}$  of an aluminum hydroxide gel was also able to improve total IgG titres after 28 days (Xie *et al.*, 2009).

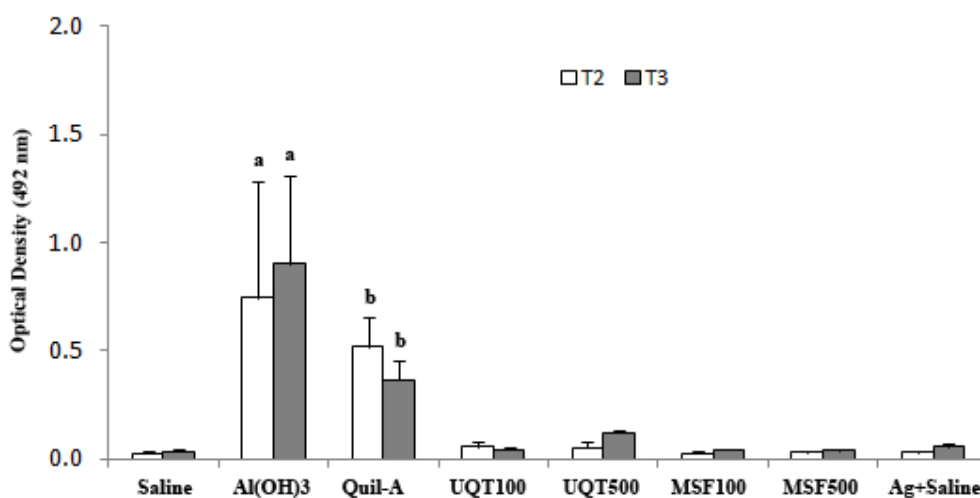
IgG1 as well as IgG2a titres assayed at the days 28 and 42 are presented on Fig. 4 and 5.



**Fig. 4.** IgG1 antibody titres, represented as optical density at 492 nm using indirect ELISA. Mice were immunized on days 0 and 14 and sera were analysed on days 28 and 42 (T2 and T3 respectively). Statistical significance:  $p < 0.001$  (a). Groups were compared with antigen added to saline.

IgG1 and IgG2a titres were significantly increased for Quil-A and Aluminum hydroxide after 28 and 42 days. For both adjuvants the Th-2 response showed to be stronger than Th-1 as demonstrated by the higher IgG1 levels. Aluminum hydroxide presented higher titres for both IgG1 and IgG2a after 28 and 42 days while Quil-A titres started to decrease after 42 days. UQT and MSF titres were not significantly increased.





**Fig. 5.** IgG2a antibody titres, represented as optical density at 492 nm using indirect ELISA. Mice were immunized on days 0 and 14 and sera were collected on days 28 and 42 (T2 and T3 respectively). Statistical significance:  $p < 0.001$  (a) and  $p < 0.001$  (b). Groups were compared with antigen added to saline.

This was the first report aiming the screening of saponins as adjuvants for BoHV-5 viral vaccines. Saponins from *Ilex paraguariensis* and *Uncaria tomentosa*, could not increase significantly total IgG titres. Total IgG obtained for Quil-A, although significant, was lower than aluminum hydroxide after 42 days and moreover, IgG1 and IgG2a were not kept constant with time. For aluminum, a predominantly Th-2 like response is generally ascribed, nevertheless, increased IgG2a levels were also observed for all times indicating that aluminum could possibly be considered as an adjuvant for BoHV-5 vaccines. In view of the modest effect found for *Ilex paraguariensis* and *Uncaria tomentosa*, further studies are needed to confirm the engagement of the saponins fractions in the immune effect related for both species in the traditional medicine.

## **Acknowledgments**

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support and Laboratório Induquímica and Ervateira Barão for cat's claw bark and mate donation.

## References

- Aquino, R., Vicenzo, F., Francesco, S., 1989. Plant Metabolites. structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. J. Nat. Prod., 52, 679-685.
- Aquino, R., Vicenzo, F., Francesco, S., 1991. Plant Metabolites. New compounds and anti inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. J. Nat. Prod., 54, 453-459.
- Daines A. M., Greatrex B. W., Hayman C. M., Hook S. M., Mcburney W. T., Rades T., Rendle P. M.; Sims I. M., 2009. Mannosylated saponins based on oleanolic and glycyrrhizic acids. Towards synthetic colloidal antigen delivery systems. Bioorg. Med. Chem., 17, 5207-5218.
- Fischer, G., Cleff, M.B., Dummer, L.A., Paulino, N., Paulino, A.S., Vilela, C.D.O., Campos, F.S., Storch, T., Vargas, G.D., Hübner, S.D.O., Vidor, T., 2007. Adjuvant effect of green propolis on humoral immune response of bovines immunized with bovine herpesvirus type 5. Vet. Immunol. Immunopathol., 116, 79-84.
- Fleck, J.D., Kauffmann, C., Spilki, F., Lencina, C.L., Roehe, P.M., Gosmann, G., 2006. Adjuvant activity of *Quillaja brasiliensis* saponins on the immune responses to bovine herpesvirus type 1 in mice. Vaccine, 24, 7129-7134.
- Francis G., Kerem Z., Makkar H. P. S., 2002. Becker K. The biological action of saponins in animal systems: A review. Br. J. Nutr, 88, 587-605.
- Gosmann, G., Guillaume, D., Taketa, A.T.C., Schenkel, E.P., 1995. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. J. Nat. Prod., 58, 438-441.
- Gosmann, G., Schenkel, E.P., Seligmann, O., 1989. A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. J. Nat. Prod., 52, 1367-1370.
- Heitzman, M.E., Neto, C.C., Winiarz, E., Vaisberg, A.J., Hammond, G.B., 2005. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria*. Phytochemistry, 66, 89-98.

Lemaire, I., Assinewe, V., Cano, P., Awang, D.V., Arnason, J.T., 1999. Stimulation of interleukin-1 and-6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (uña de gato). *J. Ethnopharmacol.*, 64, 109-115.

Mahy, B.W.J., Kangro, H.O., 1996. *Virology Method Manual*. London: Harcourt Brace & Company. 374 pp.

Mutwiri, G., Gerdt, V., Lopez, M., Babiuk, L.A., 2007. Innate immunity and new adjuvants. *Rev. Sci. Tech.*, 26, 147-156.

Oda, K., Matsuda H., Murakami T., Katayama, S., Ohgitani, T., Yoshikawa, M., 2003. Relationship between adjuvant activity and amphipathic structure of soyasaponins. *Vaccine*, 21, 2154-2160.

Oda, K., Matsuda, H., Murakami, T., Katayama, S., Ohgitani, T., Yoshikawa, M., 2000. Adjuvant and haemolytic activities of 47 saponins derived from medicinal and food plants. *Biol. Chem.*, 381, 67-74.

Oliveira-Freitas, E., Casas, C.P., Borja-Cabrera, G.P., Santos, F.N., Nico, D., Souza, L. O.P., Tinoco, L.W., Da Silva, B.P., Palatnik, M., Parente, J.P., Palatnik-De-Sousa, C. B., 2006. Acylated and deacylated saponins of *Quillaja saponaria* mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, 24, 3909-3920.

Paul, J., 1970. *Cell and tissue cultures*. London: Churchill Livingstone. 484 pp.

Pavei, C., Guzzato, P., Ros Petrovick, P., Gosmann, G., González-Ortega, G., 2007. Development and validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (mate) fruits. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 30, 87-95.

Pavei, C., Kaiser, S., Borré, G.L., Gonzalez-Ortega, G. LC method for quinovic acid glycosides assay in Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*), 2009, *submitted*.

- Peixoto, M.P.G., Treter, J., Pavei, C., Borré, G.L., Verza, S.G., Cibulski, S., Roehe, P. M., Gosmann, G., Dreiss, C.A., Ortega, G.G. Saponins from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate) fruits: LC-UV assay and haemolytic activity, 2009, *submitted*.
- Pickering, R.J., Smith, S.D., Strugnell, R.A., Wesselingh, S.L., Webster, D.E., 2006. Crude saponins improve the immune response to an oral plant-made measles vaccine. *Vaccine*, 24, 144-150.
- Quenelle, D.C., Collins, D.J., Rice, T.L., Prichard, M.N., Marciani, D.J., Kern, E.R., 2008. Effect of an immune enhancer, GPI-0100, on vaccination with live attenuated herpes simplex virus (HSV) type 2 or glycoprotein D on genital HSV-2 infections of guinea pigs. *Antiviral Res.*, 80, 223-224.
- Roehe P. M., Silva T. C. D., Nardi N. B., Oliveira L. G., Rosa J. C. D. A., 1997. Diferenciação entre o vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina (Bhv-1) e herpesvírus da encefalite bovina (Bhv-5) com anticorpos monoclonais. *Pesqui. Vet. Bras.*, 17, 41-44.
- Sandoval, M., Okuhama, N.N., Zhang, X.-J., Condezo, L.A., Lao, J., Angeles, F.M., Musah, R.A., Bobrowski, P., Miller, M.J.S., 2002. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cats claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* 9, 325–337.
- Shams H., 2005. Recent developments in veterinary vaccinology. *Vet. J.*, 170, 289-299.
- Song, X., Hu, S., 2009. Adjuvant activities of saponins from traditional Chinese medicinal herbs. *Vaccine*, 27, 4883-4890.
- Souza, L.F.L., Silva-Júnior, A., Freitas, C.M.B., Freitas E.C., Flores E.F., Almeida M.R., Moraes, M.P, 2009. Immunogenicity of bovine herpesvirus 5 isolates as vaccine candidates. *Cienc. Rural*, 39, 167-172.
- Sun, H.X., Xie, Y., Ye, Y.P., 2009. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*, 27, 1787-1796.

Taketa, A.T.C., Breitmaier, E., Schenkel, E.P., 2004. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (mate). J. Braz. Chem. Soc., 15, 205-211.

Vordermeier M., Hogarth P., 2005. Vaccine development in the 21st century: A time of living dangerously. Vet. J., 170, 271-272.

Wagner, H., Kreutzkamp, B., Jurcic, K., 1985. Die Alkaloide von *Uncaria tomentosa* und ihre Phagozytosesteigernde Wirkung. Planta Med., 51, 419-423.

Xie Y., Sun H-X, Li D., 2009. Platycodin D is a potent adjuvant of specific cellular and humoral immune responses against recombinant hepatitis B antigen. Vaccine, 27, 757-764.

## ***BIOGRAFIA***

## **FORMAÇÃO ACADÊMICA**

- 1998 - 2002      Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo
- 2000 - 2002      Bolsista de Iniciação Científica. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências Farmacêuticas. Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas. Bolsista FAPESP.
- 2003 - 2005      Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos. Orientador: Prof. Dr. Luís Alexandre Pedro de Freitas. Bolsista CNPq
- 2006 - 2009      Doutorado em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientador: Prof. Dr. George González Ortega. Bolsista CNPq
- 2009 - 2009      Estágio de Doutorado no Exterior. Faculdade de Farmácia. Kings College – University of London. Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cécile Ayako Dreiss. Bolsista CAPES.

## **PRODUÇÃO CIENTÍFICA**

### **Artigos publicados**

Marreto, Ricardo Neves; Peixoto, Maria Paula Garofo, Teixeira, C. C. C., Freitas, Luís Alexandre Pedro. Analysis of pressure fluctuation during water evaporation in spouted bed. Canadian Journal of Chemical Engineering, v.87, p.386 - 393, 2009.

Marreto, Ricardo Neves, Peixoto, Maria Paula Garofo, Tacon, Luciana, Freitas, Luís Alexandre Pedro De Paste Residence Time In A Spouted Bed Dryer I: The Stimulus Response Methodology. Drying Technology, v.25, p.821 - 830, 2007.

Oliveira, Helder Vinícius, Peixoto, Maria Paula Garofo, Freitas, Luís Alexandre Pedro. Study on the efficiency of hard gelatin capsules coating in a spouted bed. Drying Technology, v.23, p.2039 - 2053, 2005.



### **Artigos aceitos para publicação**

Canto, G. S., Treter, J., Yang, S., Borré, G. L., Peixoto, Maria Paula Garofo, Ortega, G. G. Evaluation of foam properties of saponin from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae) fruits. RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, 2009.

### **Trabalhos completos publicados em anais de eventos**

Peixoto, Maria Paula Garofo; Marreto, Ricardo Neves; Freitas, Luís Alexandre Pedro. Avaliação do método de estímulo-resposta na determinação do tempo de residência de pastas em leito de jorro. In: XXXI Encontro Nacional de Sistemas Particulados, 2004, Uberlândia.

Peixoto, Maria Paula Garofo, Freitas, Luís Alexandre Pedro. Determinação do tempo de residência de pastas durante a secagem em leito de jorro In: International Drying Symposium, 2004, São Paulo.

**Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo): 6 trabalhos**