

Atividades antinociceptiva e antimicrobiana de *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King et H. Rob. (Asteraceae)

Antinociceptive and antimicrobial activities of *Ageratum fastigiatum* (Gardn.) R. M. King et H. Rob. (Asteraceae)

Glauciemar Del-Vechio¹, Orlando Vieira de Sousa², Célia Hitomi Yamamoto² & Maria Auxiliadora Coelho Kaplan³

RESUMO – Extrato metanólico (EM), frações hexânica (FH) e diclorometânica (FD) de *Ageratum fastigiatum* foram investigadas para avaliar as atividades antinociceptiva e antimicrobiana pelos métodos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, tempo da lambida da pata induzida por formalina e difusão em agar. As doses de 200 e 400mg/kg de EM, FH e FD inibiram as contorções, enquanto ambas as fases do tempo de lambida foram reduzidas nas doses testadas ($p < 0,05$). Amostras (50 mg) de EM, FH e FD foram especialmente ativas contra *S. aureus*, *S. mutans*, *S. typhosa*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, especialmente o conteúdo de 50mg. Os resultados sugerem que os extratos de *A. fastigiatum* possuem atividades analgésica e antimicrobiana e podem constituir alvo potencial para uso em terapias da dor e de infecção.

PALAVRAS-CHAVE – *Ageratum fastigiatum*, atividade antinociceptiva, atividade antimicrobiana.

SUMMARY – *Ageratum fastigiatum crude methanol extract (EM), hexane (FH) and dichloromethane (FD) fractions were evaluated to antinociceptive and antimicrobial activities by the induction of abdominal contortion using the acetic acid and paw licking by formalin and agar diffusion assays. Doses of 200 and 400mg/kg of EM, FH and FD inhibited the contortions, while both phases of paw licking assay were reduced at the tested doses ($p < 0.05$). Samples (50mg) of EM, FH and FD were specially actives against *S. aureus*, *S. mutans*, *S. typhosa*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. The results suggest the *A. fastigiatum* possess analgesic and antimicrobial activities and that it may constitute a potential target for the use in pain and infection therapies.*

KEYWORDS – *Ageratum fastigiatum*, antinociceptive activity, antimicrobial activity.

INTRODUÇÃO

Plantas medicinais constituem uma das mais importantes fontes de substâncias ativas com potencial terapêutico e são frequentemente usadas nos países em desenvolvimento (Farnsworth, 1989; Schulz *et al.*, 2002). Em especial, o uso de plantas medicinais como agentes analgésicos e antimicrobianos é uma prática comum nesses países, embora seus princípios ativos não sejam conhecidos. No entanto, a avaliação dos efeitos farmacológicos dos extratos pode ser usada como estratégia para pesquisar novos medicamentos de origem vegetal (Javan *et al.*, 1997).

A família Asteraceae possui cerca de 1.000 gêneros e 25.000 espécies, sendo encontrada em diferentes localidades. No Brasil, essa família é representada por 300 gêneros e 2.000 espécies (Souza & Lorenzi, 2005). Muitas plantas dessa família são conhecidas pelas suas propriedades medicinais e diversas espécies possuem atividades analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana (Lorenzi & Matos, 2002). O gênero *Ageratum* consiste de aproximadamente 30 espécies, sendo que o *A.*

conyzoides é o mais estudado do ponto de vista químico e farmacológico (Okunade, 2002).

Ageratum fastigiatum (Gardn.) R. M. King et H. Rob., uma Asteraceae da tribo Eupatoriae, conhecida popularmente como matapasto, é uma planta tropical encontrada na região Sudeste do Brasil, especialmente em Minas Gerais (Guimarães *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2004). Propriedades farmacológicas de *A. fastigiatum* não têm sido bem estudadas, no entanto, substâncias da classe dos terpenóides têm sido identificadas (Bohlmann *et al.*, 1981), como, por exemplo, derivados do farneseno (Bohlmann *et al.*, 1983). Devido a relatos populares sobre o uso como analgésico e antimicrobiano (Del-Vechio-Vieira *et al.*, 2005), foi investigada a ocorrência dessas propriedades em extratos das folhas de *A. fastigiatum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

A. fastigiatum foi coletada em São João Del-Rei/MG

Recebido em 04/4/2007

¹Bolsista de Doutorado/CAPES, Curso de Pós-Graduação em Botânica, Museu Nacional/UFRJ; ²Depto. Farmacêutico/FFB - UFJF; ³Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, CCS/UFRJ

no mês de março de 2005. Uma exsicata da planta, identificada por Dr. Roberto Lourenço Esteves, encontra-se depositada no Herbário da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (nº 10.329), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Após coleta, as folhas foram submetidas à desidratação em temperatura de 50°C, com ventilação forçada, até a perda de 90 a 95% de sua umidade. A perda da umidade foi determinada em um sistema de infravermelho SI4040 GEHAKA acoplado a uma balança digital BG200. O material botânico foi triturado em moinho mecânico e pulverizado em tamise de malha 80 para preparo do extrato metanólico.

Preparo e fracionamento do extrato

O extrato metanólico foi obtido de 240g das folhas secas em aparelho de Soxhlet durante 12h com 5 trocas de solvente. A cada troca de solvente foi usado 500mL, o que rendeu 32,62g do extrato seco após rota- evaporação. O extrato metanólico seco (EM) foi suspenso em H₂O:Metanol (9:1) e submetido à partição líquido/líquido em hexano (FH) e diclorometano (FD), obtendo-se as frações com rendimento de 7,12 e 12,76g, respectivamente (Cechinel Filho & Yunes, 1988). O extrato metanólico e as frações foram completamente secos e ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) 1% em salina para avaliar as atividades farmacológicas.

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (25-30g) machos provenientes do Centro de Biologia da Reprodução, da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum* em temperatura ambiente. Doze horas antes da realização das experiências, os animais foram privados de ração. Os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) dessa Instituição.

Atividade antinociceptiva

Teste de contorções abdominais

O extrato metanólico e as frações hexânica e diclorometânica de *A. fastigiatum* foram administrados por via oral uma hora antes da aplicação do ácido acético 0,6%. As doses administradas foram de 100, 200 e 400 mg/kg/ peso de camundongo (n = 8) (Koster *et al.*, 1959). Uma hora após tratamento, 10mL/kg de ácido acético 0,6% foram administrados intraperitonealmente em cada camundongo e o número de contorções abdominais contado entre 10 e 30min após este procedimento. O grupo controle recebeu 10mL/kg de dimetilsulfóxido 1% em salina por via oral (v.o.). Indometacina (10mg/kg) foi o fármaco usado como controle do teste.

Teste do tempo da lambida da pata

Camundongos foram injetados 20µL de formalina 2,5% (em salina estéril) no espaço subplantar da pata direita e a duração da lambida foi determinada de 0 a 5min (1ª fase) e 15 a 30min (2ª fase) após aplicação da formalina. O extrato metanólico e as frações hexânica e diclorometânica de *A. fastigiatum* foram solubilizadas em dimetilsulfóxido 1% em salina e administrada nas doses de 100, 200 e 400mg/kg, por via oral, uma hora antes da injeção da formalina (n = 8). Os animais controle receberam 10mL/kg de dimetilsulfóxido 1% em salina por via oral. Morfina (0,01mg/kg, subcutânea) foi usada como controle positivo do teste (Hunnskaar & Hole, 1987).

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi testada pelo método de difusão em Agar (Koneman *et al.*, 1997) usando as seguintes cepas pertencentes ao American Type Culture Collection Maryland, USA:

- *Staphylococcus aureus* (ATCC6538),
- *Streptococcus mutans* (ATCC25175),
- *Staphylococcus typhosa* (ATCC10708),
- *Escherichia coli* (ATCC8739),
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC15442) e
- *Candida albicans* (ATCC10231).

Cilindros estéreis de 5,5mm foram colocados, em duplicata, sobre a superfície dos meios agar caseína de soja (bactérias) e agar Sabouraud (levedura) semeados com cepa padrão e preenchidos com as soluções-teste contendo 10, 25 e 50mg do extrato ou frações de *A. fastigiatum*. Ampicilina (5µg) e nistatina (10µg) foram utilizadas como substâncias químicas de referência para bactérias e levedura, respectivamente. Após o procedimento final, as placas foram colocadas em estufa a 37 °C ± 1 por 24h para as bactérias e 24°C ± 1 durante 5 dias para a levedura. Os resultados foram obtidos pela determinação do diâmetro da zona de inibição do crescimento em milímetros (mm).

Análises estatísticas

Os resultados da atividade antinociceptiva foram demonstrados através da média ± erro padrão. Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman-Keuls foi utilizada para medir o grau de significância (p < 0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do extrato metanólico (EM) e das frações hexânica (FH) e diclorometânica (FD) das folhas de *A. fastigiatum* demonstrou que as doses de 200 e 400mg/kg reduziram as contorções abdominais (p < 0,05), produzindo inibição de 25,28 e 39,447%, 15,97 e 39,58% e 19,17 e 46,53% respectivamente (Tabela I). A indometacina inibiu 70,28% as contorções, mostrando sua eficácia como analgésico.

TABELA I
Número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% após administração de 100, 200 e 400mg/kg por via oral, dos extratos das folhas de *A. fastigiatum* (n = 8)

Grupos	Doses (mg/kg)	Nº de contorções abdominais	
		Média±E.P.	Inibição (%)
Controle	-	72,00±1,74	-
	100	65,00±1,74	9,72
	200	53,80±1,38*	25,28
EM	400	43,60±1,87*	39,44
	100	71,00±1,92	1,39
	200	60,50±1,79*	15,97
FH	400	43,50±2,02*	39,58
	100	62,00±2,00	13,89
	200	58,20±2,02*	19,17
FD	400	38,50±1,30*	46,53
	10	21,40±1,59*	70,28

*Significativo após análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman-Keuls (p < 0,05). EM (Extrato Metanólico); FH (Fração Hexânica); FD (Fração Diclorometânica).

Injeção intraplantar de 2,5% de formalina promoveu uma resposta característica bifásica (Tabela II). A duração do tempo de lambida na primeira fase (0-5min) foi de $77,20 \pm 2,60$ seg e na segunda fase (15-30min) foi de $93,00 \pm 2,58$ seg para o grupo controle. Após 60min de tratamento, todas as doses inibiram significativamente ($p < 0,05$) ambas as fases do tempo de lambida. A dose de 400mg/kg do extrato metanólico das frações hexânica e diclorometânica foi a mais ativa, causando inibição de 37,69, 44,30 e 50,00% na 1ª fase e 40,86, 43,87 e 63,45% na 2ª fase, respectivamente para EM, FH e FD.

O extrato metanólico e as frações hexânica e diclorometânica demonstraram atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus mutans*, *Staphylococcus typhosa*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. O conteúdo de 50mg foi o mais ativo, especialmente a fração diclorometânica que produziu maiores zonas de inibição do crescimento (Tabela III).

TABELA II
Tempo de lambida da pata induzida por formalina 2,5% após administração de 100, 200 e 400mg/kg, por via oral, dos extratos das folhas de *A. fastigiatum* (n = 8)

Grupos	Doses (mg/kg)	1ª Fase (s) (neurogênica)		2ª Fase (s) (inflamatória)	
		Média±E.P.	Inibição (%)	Média±E.P.	Inibição (%)
Controle	-	77,20±2,60	-	93,00±2,58	-
	100	64,40±2,09*	16,58	78,50±2,17*	15,59
EM	200	61,00±2,40*	20,98	67,10±3,49*	27,85
	400	48,10±2,55*	37,69	55,00±2,21*	40,86
	100	61,00±2,53*	20,98	68,30±2,48*	26,56
FH	200	50,70±2,39*	34,33	59,80±1,84*	35,69
	400	43,00±2,58*	44,30	52,20±2,16*	43,87
	100	60,40±2,42*	21,76	64,50±2,01*	30,64
FD	200	51,70±1,96*	33,03	45,80±1,93*	50,75
	400	38,60±1,78*	50,00	34,00±2,19*	63,45
Morfina	0,01	16,60±2,19*	78,49	12,90±1,85*	86,13

*Significativo após análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$). EM (Extrato Metanólico); FH (Fração Hexânica); FD (Fração Diclorometânica).

TABELA III
Atividade antimicrobiana dos extratos das folhas de *A. fastigiatum*

Grupos	Zona de inibição do crescimento (mm)					
	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
EM 10mg	-	-	-	-	-	-
EM 25mg	8	8	9	8	-	-
EM 50mg	11	11	10	10	9	9
FH 10mg	-	-	-	-	-	-
FH 25mg	9	8	9	7	-	-
FH 50mg	11	12	11	12	10	8
FD 10mg	-	-	-	-	-	-
FD 25mg	11	11	9	9	11	10
FD 50mg	13	14	14	13	12	13
Ampicilina 5mg	24	20	20	22	20	NT
Nistatina 10mg	NT	NT	NT	NT	NT	16

EM (Extrato Metanólico); FH (Fração Hexânica); FD (Fração Diclorometânica); NT (Não Testado).

O estudo sugeriu que EM, FH e FD possuem propriedades antinociceptiva sobre o sistema nervoso periférico e central. A atividade antinociceptiva periférica foi demonstrada pelos efeitos inibitórios das contorções abdominais e dos tempos de lambida da pata. Além da atividade antinociceptiva, o teste do tempo de lambida da pata também indicou uma possível atividade antiinflamatória (Tabela II).

Os modelos de nocicepção empregados envolvem diferentes mecanismos da dor, tais como o sistema simpático com liberação de aminas bioativas, os metabólitos da via do ácido araquidônico (Duarte *et al.*, 1988) e o sistema opióide (Collier *et al.*, 1968). O ácido acético age induzindo a liberação de mediadores endógenos que estimulam os nociceptores que são sensíveis aos antiinflamatórios não-esteróides e/ou opióides (Collier *et al.*, 1968).

A atividade dos produtos testados de *A. fastigiatum* observada na 1ª fase do tempo da lambida da pata é típica de uma ação em nível de sistema nervoso central, como demonstrado pela morfina, embora esta possua efeitos em ambas as fases (Dubuisson & Denni, 1977). No entanto, a 2ª fase é caracterizada pelo surgimento de um processo inflamatório local, onde são produzidos mediadores da inflamação. Esses mediadores são inibidos por fármacos antiinflamatórios tais como ácido acetil salicílico, indometacina e dexametasona. Como EM, FH e FD causaram efeito significativo na 2ª fase, provavelmente a diminuição do tempo da lambida da pata induzida pela formalina é devida à inibição da biossíntese de mediadores responsáveis pela inflamação, como por exemplo, inibição da ciclooxigenase e conseqüentemente das prostaglandinas (Shibata *et al.*, 1989). Isso está de acordo com os resultados de contorções abdominais, pois a indometacina, antiinflamatório não-esteróide, foi utilizado como fármaco de referência.

O extrato metanólico e as frações hexânica e diclorometânica apresentaram zonas de inibição frente a todos os microrganismos testados. Os valores dos diâmetros de inibição dos antibióticos padrões estão conforme estabelecidos na literatura (Isenberg, 1992). É observado que a fração diclorometânica apresentou maior zona de inibição, o que pode não ser devido à ação dos constituintes, e sim pelas propriedades físico-químicas dos componentes que podem influenciar na melhor difusão no meio de cultura (Koneman *et al.*, 1977; Janssen *et al.*, 1987).

CONCLUSÃO

O extrato metanólico e as frações hexânica e diclorometânica das folhas de *A. fastigiatum* possuem atividades antinociceptiva e antimicrobiana como demonstrado nos métodos empregados, sugerindo suas potencialidades para fins terapêuticos. Os resultados corroboram com as informações sobre os usos populares de *A. fastigiatum*; entretanto, estudos químico, farmacológico e toxicológico necessitam ser aprofundados para que o uso medicinal seja feito de forma segura e racional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Lourenço Esteves pela identificação botânica. À Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e à Universidade Federal de Juiz de Fora, pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Almeida, A.M.; Prado, P.I.; Lewinsohn, T.M. Geographical distribution of *Eupatorieae* (Asteraceae) in South-eastern and South Brazilian Mountain Ranges. *Plant Ecology* 2004 (174):163-81.
2. Bohlmann, F.; Ahmed, M.; King, R.M.; Robinson, H. Labdane and eudesmane derivatives from *Ageratum fastigiatum*. *Phytochemistry* 1981 (20):1434-5.
3. Bohlmann, F.; Ludwig, G.W.; Jakupovic, J.; King, R.M.; Robinson, H.A. Dauca-nolide further farnesene derivatives from *Ageratum fastigiatum*. *Phytochemistry* 1983 (22):983-6.
4. Cechinel Filho, V.; Yunes, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova* 1998 (21):99-105.
5. Collier, H.O.; Dinneen, L.C.; Johnson, C.A.; Schneider, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy* 1968 (32):295-310.
6. Del-Vechio-Vieira, G. D.V.; Sousa, O.V.; Chedier, L.M.; Senna-Valle, L.; Kaplan, M.A.C. Levantamento Etnobotânico em São João Del Rei/MG, 2005. In: 56º Congresso Nacional de Botânica, Curitiba, Pr. Anais... Curitiba: SBB, 2005. 1119p. p.706.
7. Duarte, I.D.G.; Nakamura, M.; Ferreira, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1988 (21):341-3.
8. Dubuisson, D.; Denni, S.G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977 (4):161-74.
9. Farnsworth, N.R. Screening plants for new medicines. In: Wilson, E.O. Biodiversity. Washington: National Academy Press, 1989. p.83-97.
10. Farsam, H.; Amanlou, M.; Dehpour, A.R.; Jahaniani, F. Anti-inflammatory and analgesic activity of *Biebersteinia multifida* DC. root extract. *Journal of Ethnopharmacology* 2000 (71):443-7.
11. Guimarães, A.J.M.; Araújo, G.M.; Corrêa, G.F. Estrutura fitossociológica em área natural e antropizada de uma vereda em Uberlândia, MG. *Acta Botanica Brasílica* 2002 (16):317-29.
12. Hunskaar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987 (30):103-4.
13. Isenberg, H.D. Clinical microbiology procedures handbook. Washington: American Society for Microbiology, 1992. 2nd ed., 2468 p.
14. Janssen, A.M.; Scheffer, J.J.C.; Swendsen, A.B. Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the tests methods. *Planta Medica* 1987 (53):395-8.
15. Javan, M.; Ahmadiani, A.; Semnani, S.; Kamalinejad, M. Antinociceptive effects of *Trigonella foenum-graecum* leaves extract. *Journal of Ethnopharmacology* 1997 (58):125-9.
16. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.N.; Schreckenber, P.C., Winn Jr, W.C. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Philadelphia-New York: Lippincott; 1997. 5th ed., 1395 p.
17. Koster, R.; Anderson, M.; De Beer, E. J. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings* 1959 (18):412-6.
18. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002. 544 p.
19. Okunade, A. L. *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Fitoterapia* 2002 (73):1-16.
20. Shibata, M.; Ohkubo, T.; Takahashi, H.; Inoki, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989 (38):347-52.
21. Schulz, V.; Hänsel, R. Tyler, V. E. Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde. Barueri: Ed. Manole Ltda, 2002. 4ª ed., 386 p.
22. Souza, V.C.; Lorenzi, H. Botânica sistemática. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2005. 640 p.

Endereço para correspondência

Orlando Vieira de Sousa
Univ. Fed. de Juiz de Fora, Fac. de Farmácia e Bioquímica
Campus Universitário, Martelo,
36036-330, Juiz de Fora, MG
E-mail: orlando.sousa@ufjf.edu.br