

Avaliação dos efeitos das raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen sobre o tempo de sono e crescimento bacteriano

Vigo, C.L.S.¹; Narita, E.1; Nakamura, C.V.², Marques, L.C.^{1*}

¹Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá

²Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá

Resumo

Foram realizados testes biológicos com extrato hidroalcoólico liofilizado das raízes de *Pfaffia glomerata*. O teste de tempo de sono em camundongos envolveu administração de 50 mg/kg de pentobarbital sódico (via i.p.). O extrato foi administrado em várias doses agudamente e após 10 e 30 dias de tratamento oral. No teste antibacteriano, pequena quantidade do extrato de *P. glomerata* foi misturado com o inóculo de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* diluídos 1:10 para a microdiluição em caldo. No teste de tempo de sono, no modelo agudo obteve-se efeitos depressores para as doses de 500 e 1000 mg/kg; nos animais tratados cronicamente, aos 10 dias de tratamento obteve-se efeito depressor com 50 mg/kg e efeito estimulante com 500 mg/kg; aos 30 dias de tratamento outro efeito estimulante ocorreu com a dose de 1 mg/kg. No teste antibacteriano não se observou inibição de crescimento de nenhuma das amostras das bactérias na maior concentração de 1000µg/ml do extrato. Conclui-se que o extrato das raízes de *P. glomerata* não tem efeito antimicrobiano e parece promover alguma interferência sobre o sono de animais de modo bifásico de acordo com as doses e tempos de tratamento.

Abstract

Was made biological tests with hidroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* roots. In sleeping time test in mice, the extract was administered in several doses acutely and after 10 and 30 days of oral treatment. In the antibacterial analysis, the effect of the extract was evaluated on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. In the sleeping time, in the acute model it was obtained

depressive effects for the doses of 500 and 1000 mg/kg; in the chronically treated animals, to the 10 days of treatment it was obtained depressive effect with 50 mg/kg and stimulating effect with 500 mg/kg; to the 30 days of treatment other stimulating effect happened with the dose of 1 mg/kg. In the antibacterial test growth inhibition was not observed of none of the samples of the bacteria in the largest concentration of 1000µg/ml of the extract. It is ended that the extract of the roots of *P. glomerata* doesn't have antimicrobial effect and it seems to promote interference on the sleep of animals in a two-phase way in agreement with the doses and times of treatment.

A espécie objeto deste trabalho é conhecida como fáfia, ginseng-do-Brasil, paratudo, acônito e batata-do-mato, apresentando distribuição geográfica ampla em todo o Brasil ^{4,11}. Quimicamente, é rica em saponinas triterpênicas, das quais destaca-se a β-ecdisona como marcador principal ^{1,9}.

Estudos farmacológicos mostraram diminuição no tempo de sono de camundongos tratados agudamente (perfil de ação estimulante), bem como efeitos positivos na aprendizagem e memória de ratos idosos tratados cronicamente ⁷. Teste clínico complementar avaliado por testes psicométricos confirmou efeitos positivos na memória dos voluntários, os quais relataram também efeitos subjetivos de aumento ou melhora no padrão de sono ⁶. De-PARIS e colaboradores ⁵ também avaliaram o perfil psicofarmacológico das raízes de *P. glomerata* e seus resultados apontaram, no modelo de tempo de sono barbitúrico em camundongos tratados agudamente, efeitos depressores do sistema nervoso central. Esse conjunto de dados conflitantes em relação ao perfil dessa droga vegetal sobre o sono estimulou a presente investigação, com a busca da variação de doses e tempos de tratamento.

Em relação à atividade antimicrobiana, ALCÂNTARA e colaboradores ², empregando extrato preparado com acetato de etila, avaliaram os efeitos das raízes de *P. glomerata* sobre vários microorganismos, obtendo-se positividade na inibição de crescimento com *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus fecalis*. Como nenhuma outra informação sobre tal atividade encontra-se disponível para extratos hidroalcoólicos, buscou-se esta verificação como dado adicional sobre as propriedades biológicas desse produto (extrato hidroalcoólico liofilizado).

Tempo de sono: Os testes de tempo de sono barbitúrico foram realizados na fase aguda, por via intraperitoneal, com várias doses do extrato da planta como forma de

verificar tal efeito e também de modo a fornecer dados que orientassem o tratamento crônico. Os resultados indicam que altas doses do liofilizado agudamente não alteram a latência, mas aumentam o tempo total de sono verificado no modelo. Os dados obtidos na etapa de 10 dias de tratamento mostram um efeito bifásico, com a dose de 500 mg/kg (oral) diminuindo o tempo de sono em relação ao controle, numa forte tendência à

significância ($p=0,06$) e a dose de 50 mg/kg (oral) aumentando o tempo de sono porém atingindo significância apenas quando confrontado ao grupo tratado com a dose de 500 mg/kg, mas não ao grupo controle. Na etapa de 30 dias de tratamento, a dose de 500 mg/kg não mais promove diminuição do tempo total de sono, fato que passa a ocorrer com a dose de 1 mg/kg (tabela 1).

Tabela 1. Tempo de sono barbitúrico de camundongos tratados agudamente via i.p. e cronicamente via oral com água (controle) ou várias doses de liofilizado de *P. glomerata*

Etapas	Grupos (mg/kg)	N	Latência (s)	Tempo de sono (s)
Teste agudo	Controle	10	180 ± 29	4109 ± 2668
	<i>Pfaffia</i> 1	10	203 ± 44	4875 ± 1526
	<i>Pfaffia</i> 10	10	220 ± 50	3556 ± 1917
	<i>Pfaffia</i> 100	10	193 ± 37	5424 ± 2355
	<i>Pfaffia</i> 500	9	179 ± 89	6969 ± 2499 *
	<i>Pfaffia</i> 1000	9	186 ± 59	7078 ± 2941 *
10 dias	Controle	10	171 ± 32	6264 ± 4322
	<i>Pfaffia</i> 1	10	202 ± 31	5329 ± 2754
	<i>Pfaffia</i> 50	10	232 ± 134	7533 ± 2370 **
	<i>Pfaffia</i> 500	10	253 ± 161	3549 ± 1826 (p=0,06)
30 dias	Controle	15	164 ± 98	7768 ± 4380
	<i>Pfaffia</i> 1	8	186 ± 42	3488 ± 1506 *
	<i>Pfaffia</i> 50	20	163 ± 66	7752 ± 3732
	<i>Pfaffia</i> 500	19	160 ± 60	7361 ± 3602

ANOVA - *Estatisticamente diferente do controle;

**estatisticamente diferente do grupo *Pfaffia* 500 mg (10 dias)

Os resultados obtidos neste trabalho são distintos e mesmo conflitantes, pois se encontrou efeito depressor (aumento no tempo de sono) para duas doses do teste agudo e para uma dose após 10 dias de tratamento. Por outro lado, efeitos estimulantes manifestos na diminuição do tempo de sono foram verificados num grupo após 10 dias de tratamento e em outro grupo após 30 dias de tratamento. As doses com resultados positivos igualmente foram heterogêneas, variando desde 1000 mg/kg no teste agudo até 1 mg/kg após 30 dias de tratamento.

Esse tipo de efeito - diminuição do tempo de sono - é incomum, sendo mais fácil encontrarem-se efeitos do aumento desse tempo representando uma atividade depressora central inespecífica³. Assim, embora os dados não sejam conclusivos, pode-se apontar à existência de alguma relação dos extratos de *P.*

glomerata com os sistemas centrais controladores do sono, levando-se à interferência em tais sistemas de modo bifásico, dependendo das doses empregadas e do tempo de tratamento. De fato, sabe-se que muitas drogas vegetais apresentam efeitos modulatórios sobre diversos sistemas fisiológicos, levando a resultados opostos de acordo com a dose utilizada ou com diferentes tipos de extratos empregados^{10,12}. Novos testes são necessários para aprofundar essa avaliação em relação às raízes de *Pfaffia*.

Atividade antibacteriana: A concentração inibitória mínima é definida como a menor concentração de uma substância que produz subculturas negativas ou somente uma colônia. As raízes de *P. glomerata* não apresentaram a atividade antibacteriana esperada mesmo na maior concentração inibitória empregada, conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Resultado da análise antibacteriana do extrato hidroalcoólico liofilizado das raízes de *P. glomerata*

Bactéria	Crescimento na concentração inibitória máxima (>1.000 µg/ml)	Crescimento na concentração inibitória mínima (7,8 µg/ml)
B. subtilis	Positivo	Positivo
E. coli	Positivo	Positivo
P. aeruginosa	Positivo	Positivo
S. aureus	Positivo	Positivo

Em relação à essa atividade, não foi possível verificar a existência de tal efeito para extratos hidroalcoólicos das raízes de *P. glomerata* com a metodologia empregada. Como ALCÂNTARA et al.² utilizaram extratos obtidos com acetato de etila, e no caso presente foi utilizado extrato hidroalcoólico liofilizado, provavelmente o perfil de ativos obtidos em cada caso foi diferente, levando a diferentes resultados em termos de atividade antibacteriana. Dessa forma, pode-se afirmar que o produto em avaliação - extrato hidroalcoólico liofilizado - não apresenta efeito antimicrobiano dentro dos limites do modelo utilizado.

Materiais e Métodos

Droga vegetal e extrato: O material vegetal em estudo foi coletado em Maringá no ano de 2002 e os exemplares foram submetidos à identificação pelo especialista em Amaranthaceae, prof. Dr. Josafá Siqueira, da PUC-RJ; exemplares dessa coleta foram depositados no acervo do Herbarium Friburgense (FCAB) sob o número 5426. As raízes foram lavadas, secas em estufa a 40 °C e pulverizadas. Foram então extraídas com solvente hidroalcoólico (Pat.req.) por turbólise durante 30 minutos, filtradas, liofilizadas e armazenadas em frasco opaco em freezer.

Tempo de sono induzido pelo pentobarbital sódico: O teste correspondeu à administração aos animais de uma dose de 50 mg/kg de pentobarbital sódico por via intraperitoneal, avaliando-se o tempo entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento do animal (tempo de sono). A perda desse reflexo representa a incapacidade de animal em voltar à posição normal de decúbito ventral, quando colocado na posição dorsal (decúbito dorsal). O critério para a recuperação do reflexo de endireitamento foi fixado quando o animal, por três vezes consecutivas, saía da posição de decúbito

dorsal que lhe era imposta. Esse intervalo entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento é considerado como o tempo de sono induzido pelo pentobarbital³.

Em relação ao tratamento, na fase aguda, os animais receberam, por via intraperitoneal, água e doses crescentes do liofilizado; após 60 minutos, receberam o pentobarbital sódico. Na fase crônica, foram estabelecidos quatro grupos de animais (cerca de 50 por grupo), sendo um deles o controle e os outros tratados com as doses indicadas pelo teste agudo (1; 100 e 500 mg/kg). O tratamento foi por via oral, com cânulas de inox, diariamente no período da manhã. Após 10 e 30 dias de tratamento, cerca de 15 animais por grupo foram separados e submetidos ao protocolo para verificação do tempo de sono.

Análise antibacteriana: A atividade antibacteriana foi realizada pelo Laboratório de Microbiologia Básica, do Departamento de Análises Clínicas, numa relação de colaboração. Foram utilizadas as seguintes amostras de bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. As bactérias foram cultivadas em caldo nutriente (Laboratório Difco, Detroit, MI) a 37°C e mantidas em Agar nutriente inclinado a 4°C. O inóculo foi preparado a partir de bactérias ativadas em Caldo Mueller-Hinton (CMH) por 24 horas. Este foi padronizado utilizando como suspensão padrão a solução de sulfato de bário com uma turvação que corresponda o tubo 0,5 da escala de Mc Farland em CMH. Como drogas de referência serão utilizados a penicilina para *S. aureus* e tetraciclina para *E. coli*.

Teste de susceptibilidade antimicrobiana: As concentrações inibitória mínima (MICs) de todos os extratos e dos antibióticos de referência foram determinados pela técnica da microdiluição em caldo Mueller-Hinton Merck⁸. Diluições seriadas do extrato foram realizadas em microplacas de 96 poços com caldo Mueller-Hinton, obtendo-se concentrações de 1.000 a 7,8 µg/ml. Em algumas foi adicionado 5 µl de inóculo contendo 50.000 células/100 µl. As microplacas foram incubadas a 37°C e o MICs foi registrado após 24 h de incubação. O MIC é definido como a menor concentração do composto que produz uma redução de 80% do crescimento visível quando comparado com o controle.

Análise estatística: Aplicou-se análise de variância de uma via para os dados dos testes de tempo de sono em camundongos, com p<0,05.

Agradecimentos: CNPQ-PIBIC / UEM

Bibliografia

- ¹Akisue, G.; Akisue, M.K.; Oliveira, F.; Hiobara, Y.; Nishimoto, N.; Unoue, S. & Hashimoto, G. Ginseng do Brasil: novo triterpenóide de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 12°. *Resumos*. Curitiba, UFPR, 1992.
- ²Alcântara, M.F.A.; Lima, V.; Andrade, L.H.C.; Nascimento, M. Atividade antimicrobiana de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 13°. *Resumos*. Fortaleza, UFC, 1994.
- ³Carlini, E.A. Screening farmacológico de plantas brasileiras. *Revista Brasileira de Biologia*, v.32, n.2, p. 265-274, 1972.
- ⁴Carriconde, C. Acônito: *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. De volta às raízes, v.9, n.46, p. 1-3, 1994.
- ⁵De-Paris, F.; Neves, G.; Salgueiro, J.B.; Quevedo, J.; Izquierdo, I.; Rates, S.M.K. Psychopharmacological screening of *Pfaffia glomerata* Spreng. (Amaranthaceae) in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, v.74, p. 261-269, 2000.
- ⁶Marques, L.C. *Avaliação da ação adaptógena das raízes de Pfaffia glomerata (Sprengel) Pedersen - Amaranthaceae*. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1998. Tese de doutorado em Psicobiologia.
- ⁷Marques, L.C.; Galvão, S.M.P.; Oliveira, M.G.M.; Carlini, E.A. Estudo farmacológico pré-clínico de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen - Amaranthaceae. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15°. *Resumos*. Águas de Lindóia, Fapesp, 1998.
- ⁸NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents*, Wayne, Pa., 1999.
- ⁹Nishimoto, N. The constituents of brazilian ginsengs. In: Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 12°. *Resumos*. Curitiba, UFPR, 1992.
- ¹⁰Petkov, V.D., Mosharrof, A.H. Effects of standardized ginseng extract on learning, memory and physical capabilities. *American Journal of Chinese Medicine*, v. 15, n. 1/2, p. 19-29, 1987.
- ¹¹Van Den Berg, M.E. *Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático*. Manaus, CNPQ, 1982.
- ¹²Qi-bing, M., Jing-yi, T., Bo C. Advances in the pharmacological studies of radix *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (Chinese danggui). *Chinese Medical Journal*, v.104, n.9, p.776-781, 1991.

***Autor para correspondência**

prof. Dr. Luís Carlos Marques
Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Farmácia e Farmacologia
Av. Colombo 5790, bloco T22
87020-900 - Maringá - PR
tel/fax (44) 263-6245
email: lmarques@teracom.com.br