

Abordagem Fitoquímica e prospecção do potencial antimicrobiano *in vitro* das partes aéreas de três espécies vegetais pertencentes à família Lamiaceae.

TORRES, E. C., RIBEIRO, A., SOARES, M. A.

Fundação Comunitária de Ensino Superior de Itabira, Rodovia MG-129 – Córrego Seco – Bairro Areão – Itabira –MG

RESUMO: As espécies vegetais *Leonotis nepetaefolia* (R. Br.) W. T. Aiton., *Leonurus sibiricus* L. e *Leucas martinicensis* (Jacq.) R. Br., dentre outras espécies pertencentes à família Lamiaceae, são popularmente conhecidas como Cordão-de-Frade. Na medicina popular são atribuídas às preparações contendo estas espécies propriedades tônica, estimulante, diurética, febrífuga, sudorífica, carminativa, antiespasmódica, contra dores reumáticas e inflamações urinárias. Buscou-se através deste trabalho determinar o perfil fitoquímico das três espécies, através da metodologia descrita por MATOS, 1977; avaliar a atividade antimicrobiana de seus extratos hidroalcoólico, metanólico, hexânico e em acetato de etila, sobre *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*, pela técnica de difusão em ágar através de discos (Método de Kirby-Bauer) e através de poços. Visou-se, também, estabelecer uma comparação entre as três espécies vegetais de forma a expandir o conhecimento químico e terapêutico destas espécies medicinais. Nas três plantas estudadas, foram detectados agliconas esteróides e/ou triterpenóides, saponinas, esteróides e/ou triterpenóides. Além destes compostos, foram detectados, leucoantocianidinas e taninos condensados em *L. nepetaefolia*; ácidos fixos fortes, catequinas e taninos condensados em *L. martinicensis*. Os extratos em acetato de etila apresentaram melhores resultados inibitórios em relação aos extratos hexânicos e hidroetanólicos, e o extrato metanólico não apresentou resultados positivos contra nenhum dos microrganismos testados. Embora ensaios mais minuciosos sejam necessários, os resultados contidos neste estudo caracterizam os componentes químicos presentes nas três espécies vegetais, e as atividades antimicrobianas das mesmas, e constituem uma base preliminar de dados que, poderão ajudar a estabelecer a utilidade das mesmas para o combate, controle ou mesmo prevenção de doenças.

Palavras-chave: *Leonotis nepetaefolia*, *Leucas martinicensis*, *Leonurus sibiricus*, Abordagem fitoquímica e Potencial antimicrobiano.

ABSTRACT: The vegetable species *Leonotis nepetaefolia* (R. Br.) W. T. Aiton., *Leonurus sibiricus* L. and *Leucas martinicensis* (Jacq.) R. Br., and other belonging to the Lamiaceae family, is known popularly as “Lion’s ear”. In the popular medicine they are attributed to the preparations containing this species present, diuretic, stimulant, carminative, antispasmodic, tonic properties and combat to the fever, rheumatic’s pains and urinary inflammations and too it favors the sweat production. It was looked for through this work to determine the profile phytochemistry of the three species, through the methodology described by MATOS, 1977; to evaluate the antimicrobial activity of its extracts hydroalcoholic, methanolic, hexanic and in ethyl acetate, on *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus aureus*, for the diffusion technique in agar through disks (Method of Kirby-Bauer) and through wells. It was sought to establish a comparison among the three vegetable species in way to expand the chemical and therapeutic knowledge of these medicinal species. aglycones steroids and/or triterpenoids, saponins, was detected steroids and/or triterpenoids in the three studied plants, besides these composed, they were detected, leucoanthocyanidins and tannins condensed in *L. nepetaefolia*; strong fixed acids, catechin and tannins condensed in *L. martinicensis*. The extracts in ethyl acetate presented better inhibitory results in relation to the extracts hexanic and hydroetanolic, and the extract methanolic it didn't present positive results against none of the tested microorganisms. Although more meticulous rehearsals are necessary, the results contained in this study characterize the present chemical components in the three vegetable species, and the antimicrobial activity of the same ones, and they constitute a preliminary base of data that, they can help to establish the usefulness of the same ones for the combat, control or same prevention of diseases.

keyword: *Leonotis nepetaefolia*, *Leucas martinicensis*, *Leonurus sibiricus*, Boarding phytochemistry and antimicrobial activity.

INTRODUÇÃO

A origem do conhecimento do homem sobre as propriedades medicinais das plantas confunde-se com sua própria história. Há milênios os vegetais têm sido utilizados pelos seres humanos no tratamento de doenças, porém, apenas recentemente as plantas tornaram-se objeto de estudo científico no que se referem às suas variadas propriedades medicinais, inclusive quanto a sua atividade antibacteriana ou antifúngica (NOVAIS *et al*, 2003).

Atualmente é crescente o interesse por compostos antibacterianos de origem natural, uma vez que, grande parte dos microrganismos tende a desenvolver resistência aos antibióticos rotineiramente utilizados na clínica, por uso excessivo ou até inadequado. Assim, faz - se necessário o desenvolvimento de novos estudos em uma

busca constante de novos princípios ativos contra bactérias e fungos amplamente conhecidos (PEREIRA, 2007). Embora o desenvolvimento da resistência seja um fenômeno espontâneo, as drogas atuam como seletores de amostras resistentes. A falência das terapias vigentes tem motivado a pesquisa de novas drogas que combatam estes microrganismos resistentes (FREITAS *et al*, 2002).

As espécies vegetais *Leonotis nepetaefolia* (R. Br.) W. T. Aiton., *Leonurus sibiricus* L. e *Leucas martinicensis* (Jacq.) R. Br., dentre outras espécies pertencentes à família Lamiaceae, são popularmente conhecidas como Cordão-de-Frade. Estas plantas recebem este nome devido ao agrupamento de suas flores pequenas em glomérulos, formando uma estrutura em forma de globo, dando a impressão de um

cordão. Tais exemplares apresentam, em diferentes regiões do Brasil, outros nomes comuns, como cordão-de-São-Francisco, ribim, corda-de-frade, cordão-de-frade-verdadeiro cordão-de-frade-pequeno e rubim (LORENZI & MATOS, 2002).

L. nepetaefolia é originária da África tropical, e atualmente encontra-se distribuída em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e América. A espécie apresenta ampla ocorrência nas diversas regiões do Brasil, exceto no Sul (KISSMANN & GROTH, 2000 *apud* TOMAZ *et al*, 2004). *L. sibiricus*, originária da China e da Sibéria, encontra-se vastamente distribuída pelo mundo, e é encontrada em todas as regiões do Brasil (CARNEIRO & IRGANG, 2005). *L. martinicensis* é provavelmente originária da África equatorial. É conhecida em numerosas áreas tropicais e subtropicais no mundo, incluindo Índia, China, África, América do Sul e Austrália (BEAN, 2004).

L. nepetaefolia, *L. sibiricus* e *L. martinicensis* são consideradas plantas daninhas, pois infestam solos cultiváveis. Apesar dos prejuízos ocasionados às espécies cultivadas, as três espécies são utilizadas na medicina folclórica devido a diversas propriedades terapêuticas a elas atribuídas, tais como: propriedades tônica, estimulante, diurética, febrífuga, sudorífica, carminativa, antiespasmódica, contra dores reumáticas e inflamações urinárias (LORENZI, 1991).

Estudos fitoquímicos evidenciaram na constituição de *L. nepetaefolia* a presença de diterpenos labdanos (WHITE & MANCHAND, 1970 e 1973 e GOVINDASAMY *et al*, 2002), cumarinas (PURUSHOTHAMAN *et al*, 1976), lactonas sesquiterpênicas em seu óleo essencial (VIEIRA, 1992 *apud* LORENZI & MATOS, 2002), além de flavonóides glicosídeos, triterpenóides, cafeína, alcalóides (ROBINEAU, 1995 *apud* LORENZI & MATOS, 2002), iridóides e feniletanóides glicosídeos (TAKEDA, 1999).

Estudos farmacológicos estabeleceram para *L. nepetaefolia*, atividade antifúngica (ABUBACKER & RAMANATHAN, 2003). Em experimentos realizados com animais, o

chá e o extrato hidroalcoólico das partes aéreas da planta provocaram um relaxamento da musculatura lisa, aumento da força de contração do coração *in vitro* e relaxamento dose-dependente em útero de cobaia (CALIXTO *et al*, 1991). As mesmas preparações citadas anteriormente (chá e extrato hidroalcoólico), apresentam também, ação antiedematogênica e antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (ROBINEAU, 1995).

Investigação das propriedades químicas e farmacológicas de *Leonurus sibiricus*, resultou no isolamento de alcalóides (MURAKAMI, 1943 *apud* ALMEIDA *et al*, 2006), furano-lactonas diterpênicas com atividade citotóxica moderada contra células de leucemia (L 1210) em cultura de tecidos (SATO *et al*, 2003), diterpenos labdanos e uma flavona (BOALINO *et al*, 2004).

Atividades antimicrobiana (AHMED *et al*, 2006; SOUZA *et al*, 2004), analgésica e antiinflamatória (ISLAM *et al*, 2005 *apud* DE ALMEIDA), e contra náuplios de *Artemia salina* (ALVES *et al*, 2000) foram relatadas para os extratos orgânicos de *L. sibiricus*.

Para *L. martinicensis*, as indicações de uso popular são semelhantes às de *L. nepetaefolia* e *L. sibiricus*. Ensaios farmacológicos mostraram atividade hipotensora, relaxante e estimulante da musculatura lisa para o extrato metanólico (CHAGNON, 1984 *apud* LORENZI & MATOS, 2002); e atividade antidiarréica, com ação contra as bactérias patogênicas *Salmonella* e *Shigella* (MAYKERE – FANIYO *et al*, 1984 *apud* LORENZI & MATOS, 2002). Estudos fitoquímicos revelaram a presença de um glicosídeo iridóide (KOOIMAN, 1972 *apud* LORENZI & MATOS, 2002).

A maioria dos estudos com as três espécies vegetais foram realizadas com plantas da África e Ásia. Estudos com espécimes brasileiras são poucos no que se refere a constituintes químicos e atividades biológicas.

OBJETIVOS

Estabelecer o perfil fitoquímico de cada uma das espécies, através da identificação de seus metabólitos secundários por meio de ensaios químicos qualitativos com a utilização de reagentes de precipitação e/ou de mudança de coloração.

Determinar a atividade antimicrobiana de extratos aquosos e orgânicos de cada uma das espécies relacionadas através do teste de difusão por discos e por poços em Ágar Mueller- Hinton e Sabouraud.

Comparar os dados obtidos com os da literatura visando expandir o conhecimento químico e microbiológico sobre as três espécies vegetais.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta do material vegetal e preparação.

O material vegetal foi coletado na cidade de Inhapim em Minas Gerais, localizada entre as Latitude 19° 32' 56" S e Longitude 42° 7' 12" W, situada na mesorregião Vale do Rio Doce, Microrregião de Caratinga, situada a 280 Km da capital Belo Horizonte.

A identificação das espécies procedeu baseando-se em LORENZI & SOUZA, 2005 e LORENZI & MATOS, 2002.

Exemplares floridos de cada espécie foram utilizados para a produção de exsiccatas posteriormente registradas no Herbário da FUNCESI sob os números 184, 185 e 25, para *L. nepetaefolia*, *L. martinicensis* e *L. sibiricus*, respectivamente.

Após a coleta, o material vegetal foi seco em temperatura ambiente e local ventilado por um período de uma semana. Depois de seco, foi seccionado manualmente com o auxílio de uma tesoura comum (para as partes maleáveis) e de uma tesoura de coleta de frutos (para os caules). O material foi armazenado em frascos de vidro com tampa em local fresco e seco.

2. Ensaio Químicos

Os ensaios de detecção dos diversos constituintes químicos de cada espécie vegetal foram realizados em cada uma das três plantas, de acordo com a metodologia descrita

por MATOS, 1977, com algumas modificações.

3. Ensaio microbiológicos

Foram preparados asépticamente três erlenmeyers e três tubos contendo meio líquido BHI (Biobrás), e um erlenmeyer e um tubo contendo meio líquido SB (Himédia), para a preparação dos microrganismos antes da inoculação em placas para o teste de difusão.

As linhagens de microrganismos testadas foram *Candida albicans* ATCC 10231, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 8739 estocadas em tubos eppendorfs contendo meio Skin líquido Milk (Biobrás) e mantidos por volta de -18°C.

Para o teste de difusão em Ágar foram preparadas 38 placas de Petri contendo meio Müller – Hinton (MH) sólido e 12 contendo meio Sabouraud (SB) sólido. Foram autoclavados cerca de duzentos discos de papel de filtro qualitativo com 10 mm de diâmetro para a dispersão do extrato.

3.1. Preparação dos Extratos

Procedeu-se a preparação dos extratos de cada uma das três plantas utilizando como solvente o Hexano (Vetec), Acetato de Etila (Isofar), Metanol (FMaia) e Etanol: Água (7:3); totalizando doze tipos de extratos.

Dez gramas do material vegetal seco e seccionado foi mantido em contato com 25 mL de cada solvente por um período de 24 horas, em béqueres de vidro enrolados com filme PVC e sob capela, a fim de tentar evitar a evaporação do solvente.

Após 24 horas o sobrenadante foi redissolvido em 25 mL do solvente e filtrado a vácuo, utilizando-se kitsatos, funis de Buckner e papéis de filtro qualitativo devidamente autoclavados. Os extratos foram transferidos para balões de fundo redondo, de 100 mL, e concentrados a secura em Evaporador Rotatório (Fisaton - 801) sob rotação de aproximadamente 80 rpm em temperatura em torno de 50°C.

3.2. Preparação do Inóculo

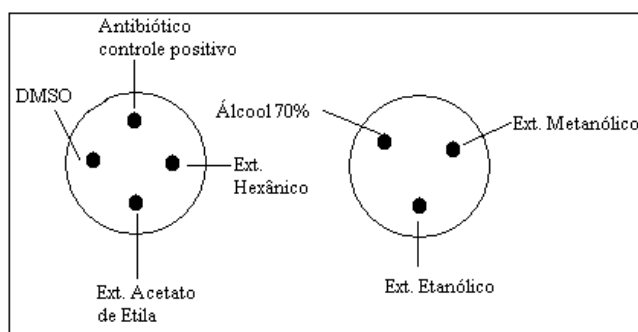
De eppendorfs com soluções estoque contendo os microrganismos, inoculou-se cada microrganismo em tubos contendo 3 mL de meio BHI líquido (para *E. coli*, *S. aureus* e *M. luteus*) e meio SB líquido (para *C. albicans*). Após cerca de 12 horas foram transferidos 3 mL para erlenmeyers de 250 mL contendo 90 mL dos mesmos meios líquidos. Após 24 horas de crescimento foi aferida e nivelada a D.O. dos microrganismos, utilizando o espectrofotômetro (Coleman) com comprimento de onda em 540 nm.

No momento do uso foram inoculados 50 µL de células no centro das placas de meio MH sólido (para *E. coli*, *S. aureus* e *M. luteus*) e meio SB sólido (para *C. albicans*) e espalhadas com o auxílio de alça de Drigalski estéril.

3.3. Teste de difusão em Ágar por discos (Método de Kirby-Bauer)

Foram inseridos discos de papel de filtro autoclavados nas placas contendo os microrganismos inoculados. Sobre cada um destes discos, adicionou-se 20 µL do extrato a ser testado. Em cada placa, um disco contendo o controle negativo (DMSO e Álcool 70°) foi mantido. Foram utilizados como controles positivos os seguintes antibióticos: Clindamicina 2 mg (CLI) para *M. luteus*, Polimixina 300 mg (POL) para *E. coli*, Tetraciclina 30 mg (TET) para *C. albicans* e Cefadroxina (CFD) 30 mg para *S. aureus*. Os discos foram dispersos como representa a figura 1.

Figura 1. Forma de dispersão dos discos nas placas de Petri.



As placas foram mantidas em geladeira por uma hora e após foram incubadas em estufa bacteriológica (Quimis – mod 316B12) por 24 horas. Após este período foram observados os resultados.

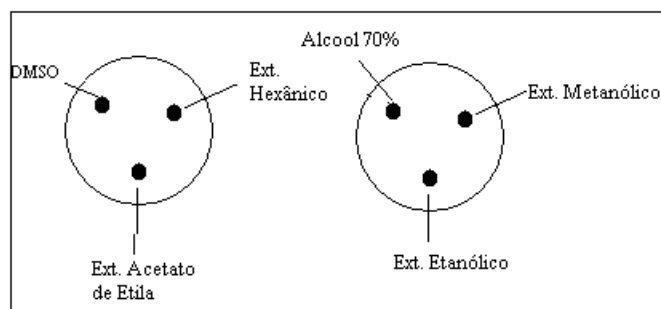
Os resultados positivos foram repetidos para obter confirmação.

3.4. Teste de difusão em Ágar por poços

Em placas contendo os microrganismos inoculados, fez-se furos utilizando ponteiras para 1000 µL estéreis

com a fase superior voltada para baixo. Os poços foram vedados com quantidade suficiente de Ágar 3 %. Em cada poço foi depositado 50 µL de extrato ou controles negativos (DMSO e álcool 70 %). Por esta técnica não foram utilizados controles positivos, pois os antibióticos disponíveis na instituição já são obtidos comercialmente dispersos em discos. Os extratos foram dispersos nos poços como representa a figura 2.

Figura 2. Forma de dispersão dos extratos nos poços das placas de Petri.



RESULTADOS

1. Abordagem fitoquímica

Os resultados obtidos com os métodos da abordagem fitoquímica clássica, para a detecção dos constituintes químicos dos extratos em etanol-água (7:3) e éter etílico das três espécies vegetais, encontram-se listados na tabela 2.

Observou-se que *L. nepetaefolia*, apresenta em seu extrato hidroalcoólico (hidrofílico) agliconas esteróides e/ou triterpenóides, identificada pelo teste descrito no item 2.2.20 através do desenvolvimento de coloração pardo - amarelada; leucoantocianidinas através do teste 2.2.4 onde no tubo em que o extrato desenvolveu coloração pardo - amarelada após ser acidificado; saponinas no teste 2.2.9 através do desenvolvimento de espuma persistente e confirmado no teste 2.2.10 com a precipitação das agliconas hidrolisadas e não formação de

espuma após o tratamento com HCl concentrado; e taninos condensados através do desenvolvimento de coloração verde com precipitado escuro no item 2.2.2. No extrato etéreo (lipofílico) foram detectados esteróides e/ou triterpenóides pelo teste de Lieberman – Buchard com o desenvolvimento de coloração esverdeada, ambos no teste 2.3.8.

O resultado foi duvidoso para alcalóides, em *L. nepetaefolia*, pois através dos ensaios com os reagentes de precipitação para alcalóides (Wagner, Mayer e Dragendorff) descrito no item 2.3.2.13, observou-se a formação de precipitado laranja forte com a adição do reagente de Mayer, não confirmado pelos resultados dos ensaios com os reagentes de Wagner e Dragendorff.

Os teores percentuais de extrativos em solvente hidrofílico e lipofílico de cada uma das espécies encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Teor percentual de extrativos para cada planta. (H) Extrato Hidrofílico; (L) Extrato Lipofílico.

Plantas	% de extrativos (p/v)	
	H	L
<i>L. nepetaefolia</i>	16,01	8,22
<i>L. martinicensis</i>	11,6	5,52
<i>L. sibiricus</i>	15,3	7,78

L. martinicensis, apresentou em seu extrato hidroetanólico ácidos fixos fortes pelo teste com reagente de Nessler, descrito em 2.2.11, quando no papel-reagente se desenvolveu uma coloração marrom forte; agliconas esteróides e/ou triterpenóides, identificada pelo teste descrito no item 2.2.20 através do desenvolvimento de coloração pardo - amarelada; catequinas pelo teste 2.2.4 com o desenvolvimento de coloração pardo –

amarelada em meio ácido; esteróides e/ou triterpenóides pelo item 2.2.8 através do teste de Lieberman – Buchard onde houve desenvolvimento de cor verde permanente; saponinas no teste 2.2.9 através do desenvolvimento de espuma persistente e confirmado no teste 2.2.10 com a precipitação das agliconas hidrolisadas e não – formação de espuma após o tratamento com HCl concentrado; e taninos condensados através

do desenvolvimento de coloração verde com precipitado escuro no item 2.2.2. No extrato etéreo, observou-se a presença de esteróides e/ou triterpenóides pelo teste de Lieberman – Buchard com o desenvolvimento de coloração esverdeada, ambos no teste 2.3.8.

O extrato hidroetanólico de *L. sibiricus* foram detectados agliconas esteróides e/ou triterpenóides, identificadas pelo teste descrito no item 2.2.20 através do desenvolvimento de coloração pardo - amarelada e saponinas no teste 2.2.9 através do desenvolvimento de espuma persistente. Seu extrato etéreo apresentou esteróides e/ou triterpenóides pelo teste de Lieberman –

Buchard com o desenvolvimento de coloração esverdeada, ambos no teste 2.3.8.

O resultado foi duvidoso para alcalóides, em *L. sibiricus*, pois através dos reagentes de precipitação para alcalóides (Wagner, Mayer e Dragendorff) descrito no item 2.2.13, houve formação de precipitado laranja forte com a adição do reagente de Mayer, mas não confirmado pelos outros resultados, podendo ser considerado como presentes quando o resultado é positivo para pelo menos dois dos reagentes.

A realização dos ensaios de prospecção fitoquímica para cada uma das três espécies vegetais, forneceu os resultados apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Resultado da prospecção dos constituintes químicos. (H) Extrato Hidrofílico; (L) Extrato Lipofílico; (L. n.) *Leonotis nepetaefolia*; (L. m.) *Leucas martinicensis*; (L. s.) *Leonurus sibiricus*; (+++) Forte; (++) Médio; (D) Duvidoso; (-) Ausente; (ND) Não Determinado.

Teste para	L. n.		L. m.		L. s.	
	H	L	H	L	H	L
Ácidos Fixos Fortes	-	-	+++	-	-	-
Agliconas Esteróides e/ou Triterpenóides	++	+++	++	+++	++	+++
Alcalóides	D	-	-	-	D	-
Antocianidinas	-	-	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	-	-	-	-
Antranóis	-	-	-	-	-	-
Auronas	-	-	-	-	-	-
Bases Quaternárias	-	-	-	-	-	-
Catequinas	-	-	++	-	-	-
Chalconas	-	-	-	-	-	-
Cumarinas	-	-	-	-	-	-
Fenóis simples	-	-	-	-	-	-
Flavonas	-	-	-	-	-	-
Flavonóis	-	-	-	-	-	-
Flavanonas	-	-	-	-	-	-
Flavanonóis	-	-	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	+++	-	-	-	-	-
Quinonas	-	-	-	-	-	-
Resinas	-	ND	-	ND	-	ND
Saponinas	+++	ND	+++	ND	+++	ND
Taninos Condensados	+++	-	+++	-	-	-
Taninos Pirogálicos	-	-	-	-	-	-
Xantonas	-	-	-	-	-	-

Não houve indícios da presença de antocianidinas, antocianinas, antranóis, auronas, bases quaternárias, chalconas, cumarinas, fenóis simples, flavonas,

flavonóis, flavanonas, flavanonóis, quinonas, resinas, taninos pirogálicos e xantonas em nenhuma das plantas neste estudo (nas partes aéreas).

2. Prospecção do potencial antimicrobiano

Os teores percentuais dos extratos hidrofílicos e lipofílicos de cada uma das espécies encontram-se na tabela 3.

Tabela 3. Concentração final dos extratos dissolvidos em DMSO. **(Hex)**: extrato hexânico; **(AcOEt)**: Extrato em acetato de etila; **(H₂O:EtOH)**: extrato hidroetanólico; **(MeOH)**: extrato metanólico

Extratos	<i>Leonotis nepetaefolia</i>				<i>Leucas martinicensis</i>				<i>Leonurus sibiricus</i>			
	Hex	AcOEt	H ₂ O:EtOH	MeOH	Hex	AcOEt	H ₂ O:EtOH	MeOH	Hex	AcOEt	H ₂ O:EtOH	MeOH
Concentração em µg/ µL	44	264	1551	885	53	107	836	420	26	192	1390	714

2.1. Teste de difusão em ágar por discos

Através do teste de difusão em ágar por discos, o extrato em acetato de etila de *L. nepetaefolia* apresentou, para *M. luteus*, um halo de inibição de 10,5 mm. Não inibiu o crescimento de nenhum outro microrganismo testado.

O extrato em acetato de etila de *L. martinicensis* inibiu o crescimento de *M. luteus*, apresentando halos de inibição de 11 mm. Nenhum dos outros extratos apresentou resultado positivo frente a aos outros microrganismos testados.

O extrato hexânico de *L. sibiricus* mostrou um halo de inibição de 16 mm sobre *M. luteus*, enquanto o extrato em acetato de etila apresentou um halo de 11,25 mm. O extrato em acetato de etila apresentou também um halo de inibição de 11,5 mm para *E. coli*. Nenhum dos outros extratos apresentou resultado positivo frente aos outros microrganismos.

A tabela 4 mostra os resultados de halo em mm de todos os extratos testados, juntamente com os antibióticos utilizados.

Tabela 4. Halos de inibição dos extratos de *L. nepetaefolia*, *L. martinicensis* e *Leonurus sibiricus* pela técnica de difusão em ágar por discos, em mm. **(Hex)**: extrato hexânico; **(AcOEt)**: Extrato em acetato de etila; **(H₂O:EtOH)**: extrato hidroetanólico; **(MeOH)**: extrato metanólico; **(+)** antibióticos.

Microrganism o	<i>Leonotis nepetaefolia</i>				<i>Leucas martinicensis</i>				<i>Leonurus sibiricus</i>				
	AcOE		MeO		AcOE		MeO		AcOE				
	(+)	Hex	t	H ₂ O:EtOH	H	Hex	t	H ₂ O:EtOH	H	Hex	t	H ₂ O:EtOH	MeOH
<i>C. albicans</i>	18,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	14,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,5	-	-
<i>M. luteus</i>	35,0	-	10,5	-	-	-	11	-	-	16,0	11,25	-	-
<i>S. aureus</i>	13,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.2. Teste de difusão em ágar por poços

O extrato hidroetanólico foi o único extrato de *L. nepetaefolia* a apresentar resultado positivo, com um halo de 11 mm sobre *C. albicans*. Os outros extratos foram inativos.

O extrato em acetato de etila de *L. martinicensis* apresentou halos de 15 mm sobre *C. albicans*, 13 mm sobre *E. coli* e de 16 mm sobre *M. luteus* e 14,5 sobre *S. aureus*.

O extrato hexânico apresentou halo intermediário de 24 mm sobre *S. aureus*. Nenhum dos outros extratos apresentou resultados positivos.

L. sibiricus apresentou resultados positivos com os extratos em acetato de etila sobre *C. albicans*, *E. coli* e *M. luteus* com halos de 15,5 mm, 17 mm e 16 mm, respectivamente. O extrato em acetato de etila apresentou halo intermediário de 16 mm

sobre *S. aureus*. Os outros extratos apresentaram resultados negativos.

A tabela 6 mostra os resultados de halo em mm de todos os extratos testados por este método.

Tabela 6. Halo de inibição dos extratos de *L. nepetaefolia*, *L. martinicensis* e *L. sibiricus* pela técnica de difusão em ágar por poços, em mm. **(Hex)**: extrato hexânico; **(AcOEt)**: Extrato em acetato de etila; **(H₂O:EtOH)**: extrato hidroetanólico; **(MeOH)**: extrato metanólico; **(i)**: halo intermediário.

Microorganismo	<i>Leonotis nepetaefolia</i>				<i>Leucas martinicensis</i>				<i>Leonurus sibiricus</i>			
	AcOE		H ₂ O:EtOH	MeOH	Hex	AcOEt	H ₂ O:EtOH	MeOH	Hex	AcOEt	H ₂ O:EtOH	MeOH
<i>C. albicans</i>	-	-										
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	13,0	-	-	-	17,0	-	-
<i>M. luteus</i>	-	-	-	-	-	16,0	-	-	18,0	16,0	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	(i)	14,5	-	-	-	16,0 (i)	-	-

DISCUSSÃO

1. Perfil fitoquímico

A abordagem fitoquímica clássica (MATOS, 1977), utilizada para identificação dos grupos químicos presentes nos extratos em etanol-água (7:3) e em éter etílico, das espécies vegetais *L. nepetaefolia*, *L. sibiricus* e *L. martinicensis*, investigadas neste trabalho, permitiu detectar os componentes listados na tabela 2.

De acordo com estes resultados, agliconas esteróides e/ou triterpenóides, e saponinas foram detectadas nos extratos hidrofílicos das três plantas. Agliconas triterpenóides e/ou esteróides foram também, detectadas nos extratos lipofílicos das três plantas. Taninos condensados foram detectados nos extratos hidrofílicos de *L. nepetaefolia* e *L. martinicensis*. Ácidos fixos fortes e catequinas foram detectados apenas no extrato hidrofílico de *L. martinicensis* e Leucoantocianidinas apenas no extrato hidrofílico de *L. nepetaefolia*. A detecção de alcalóides apresentou resultado duvidoso nos extratos hidrofílicos de *L. nepetaefolia* e *L. sibiricus*.

A presença de triterpenóides em *L. nepetaefolia* encontrou confirmação nos estudos de ROBINEAU, 1995 *apud* LORENZI & MATOS, 2002. Para esta espécie vegetal, a literatura registra também,

o isolamento de outras estruturas terpenóides, como diterpenos labdanos (WHITE & MANCHAND, 1970 e 1973; GOVINDASAMY, 2002) e lactonas sesquiterpênicas (VIEIRA, 1992 *apud* LORENZI & MATOS, 2002). Neste trabalho, a presença de alcalóides pode ser inferida apenas a partir do ensaio positivo com a utilização do reagente de Mayer sendo, de acordo com a metodologia seguida (MATOS, 1977) considerado duvidoso. Entretanto, no estudo de ROBINEAU, 1995 *apud* LORENZI & MATOS, 2002, é reportada a presença de alcalóides na planta. No estudo realizado neste trabalho, flavonóides também foram detectados na composição da planta, mas não o foram na espécie estudada no presente trabalho. Cumarinas não foram detectadas nesta abordagem, mas o isolamento desta classe de compostos é reportado por PURUSHOTHAMAN *et al*, 1976. A detecção de esteróides, leucoantocianidinas, saponinas e taninos para *L. nepetaefolia* é reportada pela primeira vez no presente trabalho.

L. sibiricus apresentou resultado positivo para agliconas esteróides e/ou triterpenóides, fato não registrado na literatura consultada. Entretanto, existem relatos do isolamento de furano-lactonas diterpênicas (SATO *et al*, 2003), diterpenos labdanos (BOALINO *et al*,

2004) e mono, sesqui e diterpenos (SAVONA *et al*, 1982; ALMEIDA *et al*, 2005). Catequinas, saponinas e taninos condensados encontrados neste trabalho, também não foram descritos na literatura consultada. Alcalóides (LUO *et al*, 1985) e flavonas (BOALINO *et al*, 2004) não foram encontrados na presente abordagem fitoquímica, no entanto existem registros da detecção de alcalóides por MURAKAMI, 1943 *apud* ALMEIDA *et al*, 2005. ALMEIDA *et al*, 2005, cita a presença de ácidos fenólicos, como o ácido caféico, nas folhas, raízes e sementes da planta, o que corrobora a presença de ácidos fixos detectados no presente estudo. Diz ainda, que flavonóides como a rutina e seus derivados e flavonas metoxiladas são encontradas em extratos polares; entretanto, nesta abordagem nenhum destes constituintes foi detectado no extrato hidroalcoólico.

Estudos fitoquímicos anteriores para *L. martinicensis* revelaram apenas a presença de um glicosídeo iridóide (KOOIMAN, 1972 *apud* LORENZI & MATOS, 2002). Esta abordagem fitoquímica relata pela primeira vez a detecção das seguintes classes de metabólitos: agliconas esteróides e/ou triterpenóides, saponinas e a possível presença de alcalóides.

A presença de compostos fenólicos e terpenóides podem ser explicadas por LARCHER, 2000, pois as plantas da família Lamiaceae, dentre outras, produzem estas substâncias que normalmente possuem efeitos alelopáticos.

2. Ação antimicrobiana

Os extratos das três espécies vegetais, preparados para a utilização nos ensaios de atividade antimicrobiana, foram diluídos em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e apresentaram as concentrações especificadas na tabela 3. De acordo com os resultados tabelados, os solventes mais eficientes na extração dos constituintes das plantas foram os solventes hidrofílicos. Estes apresentaram quantidades crescentes

de extrativos para *L. martinicensis*, *L. sibiricus* e *L. nepetaefolia*, respectivamente. Os solventes lipofílicos, acetato de etila e hexano, extraíram menores quantidades. Para o extrato em acetato de etila a ordem crescente de extrativos, em relação às três espécies vegetais, foi a mesma observada para os extrato hidrofílicos. Entretanto, quando hexano foi utilizado como solvente, a maior quantidade de extrativos foi da espécie *L. martinicensis* (53 μ g/ μ L), seguida por *L. nepetaefolia* (44 μ g/ μ L) e *L. sibiricus* (26 μ g/ μ L). Observou-se ainda, que a quantidade de extrativos de *L. nepetaefolia* e *L. sibiricus* foram similares para os extratos em AcOEt, MeOH e EtOH-água, e que as quantidades obtidas para *L. martinicensis* foram aproximadamente a metade das duas espécies anteriores. Das concentrações relacionadas na tabela 3, volumes de 20 μ L foram utilizados nos testes de difusão em ágar por discos, e 50 μ L nos testes por poços.

Os microrganismos submetidos à ação dos extratos em etanol – água, metanol, hexano e acetato de etila, das partes aéreas de *Leonotis nepetaefolia*, *Leucas martinicensis* e *Leonurus sibiricus*, foram *Cândida albicans*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* e *Staphylococcus aureus*.

O *S. aureus* é um microrganismo pertencente à família Micrococcaceae, é o agente mais comum em infecções piogênicas. Embora possa ser suscetível à ação de várias drogas ativas contra bactérias Gram-positivas, é também conhecido pela sua elevada capacidade de desenvolver resistência a diversas delas. Portanto, a antibioticoterapia adequada das infecções estafilocócicas deve ser precedida da escolha da droga com base nos resultados de testes de suscetibilidade. A resistência à meticilina é relacionada a alterações das proteínas ligadoras de penicilinase. Essas linhagens resistentes a meticilina (MRSA - *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes), muitas vezes são resistentes a outros tipos de antibióticos. Para essas linhagens a droga de escolha é a

gentamicina e em caso de tratamento de infecções estafilocócicas de caráter grave é recomendado o uso da vancomicina (TORTORA, 2003; TRABULSI, 2005).

O extrato em acetato de etila de *L. martinicensis* inibiu o crescimento de *S. aureus* produzindo um halo verdadeiro de 14,5 mm (pela técnica de difusão por poços). Houve outros dois halos, mas estes foram halos intermediários, ou falsos halos, no qual extrato em acetato de etila de *L. sibiricus* e o extrato hexânico de *L. martinicensis* (pela técnica de difusão por poços) produziram halos de 16,0 e 24,0 mm respectivamente. No entanto, observou-se no perímetro do halo apenas uma alteração no padrão de distribuição das colônias, isto é havia menor quantidade de células, mas mesmo assim algumas conseguiram se desenvolver. O resultado apresentado pelo halo verdadeiro (extrato em acetato de etila de *L. martinicensis* com halo de 14,5 mm) foi melhor do que o produzido pelo controle positivo que foi uma média de 13,3 mm. O extrato hexânico em questão foi o único dos extratos hexânicos a produzir halo em *S. aureus*, mesmo que intermediário, isto pode estar relacionado a esta planta ter obtido o teor de extrativos mais alto em relação aos outros extratos hexânicos das outras plantas.

FARAGO, 2004 verificou uma discreta atividade dos óleos essenciais de *Ocimum seloi* (Lamiaceae) sobre as cepas *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus* (ATCC 25923).

Atualmente MRSA é o maior patógeno nosocomial responsável por inativar a ação de vários antibióticos, tornando a multirresistência um problema de saúde pública (STRATTON, 2000 *apud* DA SILVA *et al*, 2007).

A atividade de plantas utilizadas como antiinflamatório foram testadas em concentrações variadas quanto ao potencial antimicrobiano em cepas de *S. aureus* por CAETANO *et al*, 2002. Todos os resultados foram menores que o do controle padrão, exceto em uma amostra que foi tetraciclina resistente.

Cinco espécies de *Hyptis* (Lamiaceae) foram avaliadas quanto ao potencial antimicrobiano, mas apenas o extrato de acetato de etila da folhas e inflorescências de *H. fasciculata* apresentou ação sobre *S. aureus* (FALCÃO, 2003).

NOVAIS *et al*, 2003 testaram 137 extratos de plantas do semi-árido brasileiro, dentre elas, algumas da família Lamiaceae, mas apenas sete delas apresentaram-se ativos para *S. aureus*, nenhum extrato foi ativo contra *E. coli*. Dentre os sete extratos, quatro eram em acetato de etila e três eram hexânicos.

Sete resultados foram positivos frente a microrganismos Gram positivos e somente três frentes aos Gram negativos, isto pode ser explicado devido as bactérias Gram negativas serem naturalmente mais resistentes aos agentes antimicrobianos por apresentarem uma parede celular muito mais complexa (RANG, DALE & RITTER, 2001).

Possivelmente não houve mais inibições em Gram negativos devido à maior resistência da membrana celular (AYRES, 2008).

E. coli é um dos microrganismos não patogênicos mais prolíficos no trato intestinal humano, pertence à família Enterobacteriaceae. As cepas de *E. coli* patogênicas podem causar distúrbios gastrointestinais, dependendo do tipo de infecção podem ser classificadas em vários tipos como *E. coli* enteroinvasora (EIEC), enterotoxigênica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC) e outras. Pode causar infecções extraintestinais como meningite, bacteremia e ITU (Infecções de trato urinário), sendo responsável por cerca de 90% dos casos de ITU. Os antibióticos aconselhados são a aminopenicilina e cefalosporinas dentre outros (TORTORA, 2003).

A cepa de *E. coli* testada foi inibida apenas por extratos em acetato de etila, um pela técnica de difusão por discos e dois pela técnica de difusão por poços. Pela primeira técnica, o extrato ativo foi o de *L. sibiricus* produzindo um halo de 11,5 mm e

pela segunda técnica foi o de *L. sibiricus* com um halo de 17,0 mm e *L. martinicensis* com um halo de 13,0 mm. A Polimixina (controle positivo) formou um halo de 14,0 mm, resultado inferior ao extrato em acetato de etila de *L. sibiricus*.

BALESTRIN, 2006 correlacionou a ação de extratos hexânicos com a baixíssima polaridade de compostos extraídos pelo hexano, assim os esteróides e triterpenos, seriam extraídos por este composto, que são comumente encontrados nas plantas e conhecidos por diversas atividades de interesse biológico.

DUARTE *et al*, 2002 verificou a atividade antimicrobiana in vitro de plantas invasoras, mostrando que 9/11 extratos avaliados apresentaram efeito inibitório para duas ou mais espécies de bactérias, tanto Gram positivas, quanto Gram negativas.

A sensibilidade de cepas isoladas, dentre elas *E. coli*, de infecção urinária foi testada frente a óleos essenciais por PEREIRA *et al*, 2004. O óleo de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) inibiu 70% das cepas testadas, *Salvia officinalis* (Lamiaceae) inibiu 95% e *Cymbopogon citratus* (Poaceae) inibiu 90% das cepas.

De acordo com SCHMITT *et al*, 2003 os resultados obtidos com testes antimicrobianos feitos a partir de extratos vegetais mostram que os Gram negativos são naturalmente mais resistentes.

C. albicans é um fungo (organismo eucarioto) pertencente à família Saccharomycetaceae localizado nas mucosas do trato genitourinário e boca, seu crescimento é usualmente suprimido pela flora bacteriana normal. O fungo não é afetado por drogas antibacterianas, assim ele pode crescer e se desenvolver excessivamente no tecido mucoso quando os antibióticos suprimem a flora bacteriana normal, podendo causar a candidíase. *C. albicans* também é comum causador de vaginites. O tratamento é feito com clotrimazol, miconazol ou nistatina (TORTORA, 2003).

Todos os extratos em acetato de etila por meio da técnica de poços apresentaram

halos sobre *C. albicans*. Os resultados de 11,0, 15,0 e 15,5 mm para os extratos de *L. nepetaefolia*, *L. martinicensis* e *L. sibiricus*, respectivamente, não foram tão eficazes quanto ao controle positivo utilizado que formou um halo médio de 18,5 mm em uma concentração muito menor.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos aquosos de diferentes partes de *C. citratus* feita por SCHUCK, 2001, apresentou resultados positivos com halos de 7 a 11 mm sobre *S. aureus* (ATCC 6358) e *E. coli* (ATCC 25922) para os extratos do infuso da folha seca para ambos e para o infuso da folha seca sobre *S. aureus*. Não houve resultado positivo de inibição do crescimento de nenhum dos extratos frente a *C. albicans* (ATCC 10231). O teste dos óleos voláteis sobre os mesmos microrganismos apresentou halos entre 12 e 16 mm sobre *S. aureus* (2,5% v/v) e entre 22 e 26 mm sobre *S. aureus* (3,5% v/v), nesta concentração (5µL), o óleo não inibiu o crescimento da cepa de *E. coli*. O óleo na concentração de 20µL apresentou halos de 20 a 26 mm contra *E. coli* e maiores de 30 e 40 mm sobre *S. aureus*. O óleo volátil promoveu a formação de halo de mais de 50 mm sobre *C. albicans* e até a inibição total do crescimento em concentrações menores de microrganismo. Os óleos foram ativos, em especial contra *S. aureus* e contra *C. albicans* superando os valores de inibição dos antibióticos.

MICHELIN, 2005 observou atividade de inibição dos extratos vegetais de *S. cumini* (Lamiaceae) (60mg/mL) e *Punica granatum* (Punicaceae) (100mg/mL) sobre *E. coli* (ATCC 25922); dos extratos de *S. cumini*, *Mentha pulegium* (Lamiaceae) (200 mg/mL) e *Xanthosema violaceum* (Araceae) (50 mg/mL) sobre *S. aureus* (ATCC 29213), mas nenhum dos extratos testados apresentou resultados positivos contra *C. albicans*. Ao contrário de nosso estudo, os extratos não apresentaram ação fungicida ou fungistática.

ABUBACKER & RAMANATHAN, 2003 testaram a eficácia do extrato das flores de *L. nepetaefolia* sobre fungos *Aspergillus flavus* (NTBC 101) e *A. parasiticus* (NTBC 128) produtores de aflotoxinas. Verificou-se a inibição total do crescimento de *A. flavus* na concentração de 10-15 mg/mL e de 75% de inibição do crescimento de *A. parasiticus* na concentração de 15 mg/mL.

PEREIRA, 2007 verificou atividade biológica com melhores resultados sobre bactérias Gram positivas.

PACKER & DA LUZ, 2007 pesquisou a atividade antibacteriana de produtos de origem natural e viram atividades inibitórias de óleo de malaleuca e de alecrim contra as cepas *S. aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans*. Própolis e extrato de folhas de oliva apresentaram atividade contra *S. aureus* e *E. coli*, enquanto o farnesol apresentou resultado inibitório apenas contra *S. aureus*. O óleo de alecrim (*Rosmarinus officinalis*, família Lamiaceae)

O gênero Gram positivo *Micrococcus*, também pertencentes à família Micrococcaceae, diferencia-se do gênero *Staphylococcus* por oxidar a glicose e não fermentá-la, além de conter em seu genoma cerca de 66,3 a 73,3 mol% de C+G, enquanto que *Staphylococcus* apresentam entre 30,7 e 36,4 mol%. O gênero é composto pelas seguintes espécies: *M. lylae*, *M. luteus*, *M. kristinae*, *M. nishinomiyaensis*, *M. sedentarius*, *M. halobius* e *M. antarcticus*, porém dentre elas, apenas *M. luteus* é raramente associada a infecções. Quando apresentam patogenicidade, podem causar abscessos, pneumonia, bacteremia, artrite séptica e meningite. São sensíveis a bacitracina (TRABULSI & ALTERANTHUM, 2005 e WIESER *et al*, 2002).

O microrganismo mais susceptível aos extratos, dentre os testados foi *M. luteus*. Pela técnica de difusão por poços, os extratos em acetato de etila e hexânico de *L. sibiricus* apresentaram halos de 16,0 e 18,0 mm respectivamente, e o extrato em acetato

de etila de *L. martinicensis* apresentou halo de 16,0 mm. Pela técnica de difusão por discos houve inibição do crescimento com halos de 11,0 e 11,25 para os extratos em acetato de etila de *L. martinicensis* e *L. sibiricus*; o extrato hidroetanólico de *L. nepetaefolia* foi o único deste solvente a formar halo de inibição de 10,5 mm sobre *M. luteus*, nenhum outro microrganismo foi sensível aos extratos hidroetanólicos; o extrato hexânico de *L. sibiricus* foi o único extrato hexânico a formar halo verdadeiro de 16,0 mm. Mesmo sendo o microrganismo mais sensível aos extratos, os halos formados não obtiveram resultados tão bons quanto o controle positivo que obteve halo de 35 mm.

Os compostos extraídos por hexano são compostos pouco polares e a difusão destes pelo meio é mais lenta que os compostos polares dos antibióticos controles ou até mesmo de extratos brutos, pode-se dizer que por este motivo houve poucos resultados positivos com relação aos compostos hexânicos testados. Por apresentar baixa hidrofília, ele arrasta mais facilmente grupos esteroidais, possivelmente relacionados com a atividade do extrato.

No presente estudo, a atividade antimicrobiana foi observada para o extrato em acetato de etila, sugerindo que a maioria dos compostos ativos tenham sido extraídos por este solvente.

Os controles positivo e negativo comportaram-se de conforme esperado, ou seja, o controle negativo não inibiu o crescimento microbiano e o controle positivo formou halo de inibição.

L. sibiricus foi a planta que apresentou ação antimicrobiana mais ampla, apresentou inibição do crescimento em oito dos testes (25% do total de testes desta planta), seguida por *L. martinicensis* que apresentou inibição em seis testes (18,75%), e *L. nepetaefolia* em apenas dois testes (6,25%). Em diversidade de compostos, *L. martinicensis* foi a planta que apresentou o melhor resultado, pois por este método, detectou-se sete tipos de

compostos diferentes. *L. nepetaefolia* apresentou seis classes de compostos diferentes e *L. sibiricus* quatro classes de compostos e, no entanto foi a planta que apresentou mais amplo espectro de ação microbiológica.

Observou-se uma melhor ação dos extratos em Acetato de Etila, com doze resultados positivos (50% dos extratos em acetato de etila testados) para este tipo de extrato; seguido de três resultados positivos dos extratos hexânicos (12,5%) e um resultado positivo do extrato hidroetanólico (4,1%).

Considerando a riqueza dos constituintes presentes em plantas, a atividade antimicrobiana dos extratos das espécies testadas pode ser devida à presença de compostos como taninos (compostos polifenólicos), encontrados nas plantas, uma vez que estes compostos apresentam ação antimicrobiana, e que compostos fenólicos possuem uma ação inespecífica sobre o microrganismo, rompendo a parede celular antimicrobiana e inibindo os sistemas enzimáticos para a formação da mesma (HASLAN, 1995 *apud* DA SILVA, 2007; JORGE *et al*, 1996 *apud* DA SILVA; e AKIMPELU, 2001, *apud* DA SILVA, 2007).

CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível a detecção de agliconas esteróides e/ou triterpenóides, saponinas, esteróides e/ou triterpenóides nas três plantas estudadas, além destes compostos, foram detectados, leucoantocianidinas e taninos condensados em *L. nepetaefolia*; ácidos fixos fortes, catequinas e taninos condensados em *L. martinicensis*.

Os extratos de *L. nepetaefolia* ativos contra o crescimento de microrganismos foram encontrados no extrato em acetato de etila *M. luteus* e hidroetanólico contra *C. albicans*. Para *L. martinicensis*, os extratos ativos foram em acetato de etila contra todos os microrganismos testados (pelas duas técnicas – difusão em discos e em poços -, no caso de *M. luteus*), e o extrato hexânico

contra *S. aureus*. *L. sibiricus*, apresentou os melhores resultados, o extrato em acetato de etila foi ativo contra todas as cepas testadas (para *E. coli* e *M. luteus* pelas duas técnicas) e o extrato hexânico pelas duas técnicas contra *M. luteus*.

Os extratos em acetato de etila foram mais ativos em relação aos extratos hexânicos e hidroetanólicos, e o extrato metanólico não apresentou resultados inibitórios.

Plantas endêmicas com reconhecido potencial terapêutico são utilizadas com resultados satisfatórios, mas novos estudos necessitam ser conduzidos em busca do isolamento, purificação e identificação de novos compostos químicos, sejam eles de ação antimicrobiana ou outra ação. Em futuros trabalhos esses compostos poderão ser isolados e poderá ser verificada a sua aplicabilidade na antibioticoterapia. A sociedade necessita de novos fármacos de qualidade, economicamente viáveis para combater as inúmeras ocorrências médicas e que possam ser usufruídos por todos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUBACKER, M. N., RAMANATHAN, R. Efficacy of *Euphorbia splendens* and *Leonotis nepetaefolia* on aflatoxin producing fungi *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Research Department of Botany**, National College, Tiruchirapalli 620 001, India, 2003.
- AHMED, F.; ISLAN, M. A.; RAHMAN, M. Antibacterial activity of *Leonurus sibiricus* aerial parts – Abstract. **Fitoterapy**, Bangladesh, v. 77, n. 4, p. 316 – 317, 2006.
- AKIMPELU, 2001, *apud* DA SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA – JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. DO S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572-577, Out./Dez. 2007.

- ALMEIDA, L. F. R.; DELACHIAVE, M. E. A.; e MARQUES, M. O. M. Composição do óleo essencial de rubim (*Leonurus sibiricus* L. – Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas medicinais**. n. 1, v. 8, p. 35 – 38, Botucatu, SP, 2005.
- ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological Screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95 (3): 367-373, 2000.
- AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA – JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. S. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18(1), p. 90-97, Jan./Mar. 2008.
- BALESTRIN, L. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae**. Curitiba, 2006. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná.
- BEAN, A. R. Notes on *Leucas* R.Br. (Lamiaceae) in Australia. **Australian Systematic Botany Society Newsletter**, n.118, p. 4 – 5, mar. 2004.
- BOALINO, D. M.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W. F.; TINTO, W. F. Labdane diterpenes of *Leonurus sibiricus* – Resumo. **Journal of natural products**. Washington, v. 67, n. 4, p. 714 – 717, 2004.
- CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B.; MAIA, M. B. S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 132-135, 2002.
- CARNEIRO, A. M.; IRGAND, B. E.; Origem e distribuição geográfica das espécies ruderais da Vila de Santo Amaro, General Câmara, Rio Grande do Sul. **Sér. Bot.**, Porto Alegre, v. 60, n. 2, p. 175-188, jul./dez. 2005.
- CALIXTO, J. B., YUNES, R. A., RAE, G. A. Effect of crude extracts from *Leonotis nepetaefolia* (Labiatae) on rat and guinea-pig smooth muscle and rat cardiac muscle. **J-Pharm-Pharmacol**. n. 43, v. 8, p. 529 – 534, Ago. 1991.
- CHAGNON, 1984 *apud* LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa – SP: Ed. Plantarum, 2002. p. 238-239.
- DA SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA – JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. DO S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572-577, Out./Dez. 2007.
- DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência: construindo a história de produtos naturais**, Campinas n. 7, 2007.
- DUARTE, M. G. R.; SOARES, I. A. A.; BRANDÃO, M.; JÁCOME, R. L. R. P.; FERREIRA, M. D.; DA SILVA, C. R. F.; DE OLIVEIRA, A. B. Perfil fitoquímico e atividade antibacteriana in vitro de plantas invasoras. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 20, n. 2, p. 177-182, jul./dez. 2002.
- FALCÃO, D. Q. **Estudo Químico e Farmacológico de Quatro Espécies de *Hyptis* do Estado do Rio Grande do Sul**. Rio de Janeiro, 2003. 178 p. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- FARAGO, P. V.; DE PAULA, J. P.; BITTENCOURT, J. M.; ZARPELLON, V.; CHECCHIA, L. E. M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Ocimum selloi* Benth. (Lamiaceae). **Publicações UEPG Ciências Biológicas e Saúde**, Ponta Grossa, v. 10 (3/4), p. 59-63, set./dez. 2004.
- FREITAS, A. G.; COSTA, V.; FARIAS, E. T.; LIMA, M. C. A.; SOUSA, I. A.; XIMENES, E. A. Atividade antiestafilocócica do *Plantago major* L.

- Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 64-65, 2002.
- GOVINDASAMY, L.; RAJAKANNAN, V.; VELMURUGAN, D.; BANUMATHI, S.; VASANTH S. **Structural Studies on Three Plant Diterpenoids from *Leonotis nepetaefolia*** Crystal Research and Technology, v. 37, n. 8 , p. 896 – 909, 2002.
- HASLAN, 1995 *apud* DA SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA – JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. DO S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572-577, Out./Dez. 2007.
- ISLAM *et al*, 2005 *apud* DE ALMEIDA, L. F. R. **Composição química e atividade alelopática de extratos foliares de *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae)**. Botucatu, 2006. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Botânica) – Universidade Estadual Paulista.
- JORGE *et al*, 1996 *apud* DA SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA – JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. DO S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572-577, Out./Dez. 2007.
- KISSMANN & GROTH, 2000 *apud* TOMAZ, M. A., ARAÚJO, E. F., FERREIRA, F. A., SAGRILO, E. Germinação de sementes de *Leonotis nepetaefolia* em função do estágio de maturação e posição do glomérulo na planta. **Planta Daninha, Viçosa**, v. 22, n. 3, p. 359 – 364, 2004.
- KOOIMAN, 1972 *apud* LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa – SP: Ed. Plantarum, 2002. p. 238-239.
- LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Rima Artes e Textos, 2000. 531p.
- LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; DE VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35 n.2, Mar./Apr. 2005.
- LORENZI, H. 1991. **Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. 2.ed. Nova Odessa, SP: Plantarum. 440p.
- LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa – SP: Ed. Plantarum, 2002. p. 238-241.
- LORENZI, H., SOUZA, V. C. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa – SP: Ed. Plantarum, 2005. 640 p.
- MAYKERE – FANIYO *et al*, 1984 *apud* LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa – SP: Ed. Plantarum, 2002. p. 238-239.
- MATOS, F. J. A.; **Introdução à Fitoquímica Experimental**; Ed. da UFC, Fortaleza, Ceará 1977.
- MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A.C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V.; Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 316-320, Out./Dez. 2005.
- MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R. M. V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes – Padronização, Preparação e Purificação**. São Paulo: Ed. Edgard Blücher LTDA, 1972. p. 629.
- MURAKAMI, S. Stachydrim in *Leonurus sibiricus* L. **Acta Phytochemichal**, v.13, p.161-84, 1943.
- MURAKAMI, 1943 *apud* ALMEIDA, L. F. R.; DELACHIAVE, M. E. A.; e MARQUES, M. O. M. **Composição do óleo essencial de rubim (*Leonurus sibiricus* L. – Lamiaceae)** Botucatu, SP, 2005.
- NOVAIS, T. S.; COSTA, J. F. O.; DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M.; QUEIROZ, L. P.; FRANÇA, F.; GIULIETTI, A. M.; SOARES, M. B. P.; SANTOS, R. R. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro.

- Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 05-08, 2003.
- PACKER, J. F.; DA LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102-107, Jan./Mar. 2007.
- PEREIRA, D. F. **Morfoanatomia e histoquímica comparativa entre *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze e *Alternanthera dentata* (Moench) Stuchlik; Estudo fitoquímico e biológico de *Alternanthera brasiliana***. Santa Maria, 2007. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria.
- PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 326 – 328, 2004.
- PURUSHOTHAMAN, K. K.; VASANTH, S.; CONNOLLY, J. D.; e LABBÉ, C. 4, 6, 7-Trimethoxy-5-methylchromen-2-one, a new coumarin from *Leonotis nepetaefolia*. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions n. 1, 1976.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 703 p.
- ROBINEAU, 1995 *apud* LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa – SP: Ed. Plantarum, 2002. p. 238-239.
- SATOH, M. *et al.* Studies on the constituents of *Leonurus sibiricus* L. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.51, p.341-2, 2003.
- SAVONA, G. *et al.* Diterpenoids from *Leonurus sibiricus*. **Phytochemistry**, v.21, p. 2699-2701, 1982.
- SCHMITT, A. C.; DE ALMEIDA, A. B. P. F.; DA SILVEIRA, T. A.; IWAKURA, C. T.; MENDES, K. F.; DA SILVA, M. C. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da planta *Bryophyllum pinnatum* Kurz (“Folha-da-fortuna”) colhida em Várzea Grande, Mato Grosso/Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 1, p. 55-58, 2003.
- SCHUCK, V. J. A.; FRATINI, M.; RAUBER, C. S.; HENRIQUES, A.; SCHAPOVAL, E. E. S. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Cymbopogon citratus*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 1, p.45 – 49, jan./abr., 2001.
- SOUZA, H. C. A.; BARBOSA, W. L. R.; VIEIRA, J. M. Investigação Fitoquímica e Isolamento da Substância Antibacteriana presente na Espécie *Ananas erectifolius* (curauá). **Revista Científica da UFPA**, Belém, v. 4, abr. 2004.
- STRATTON, 2000 *apud* DA SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA – JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. DO S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 572-577, Out./Dez. 2007.
- TAKEDA, T.; NARUKAWA, Y.; HADA, N. Studies on the Constituents of *Leonotis nepetaefolia*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 2, p. 284 – 286, 1999.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2003.
- TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. (Eds.). **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- VIEIRA, 1992 *apud* LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa – SP: Ed. Plantarum, 2002. p. 238-239.
- VON DREELE, R. B.; PETIT, G. R.; ODE, R. H.; PERDUE JR, R. E.; WHITE, J. D.; MANCHAND, P. S. **The crystal and molecular structure of the unusual spiro dihydrofuran diterpene nepetaefolin** v. 97, n. 21, p. 6236, oct. 1975.
- WHITE, J. D.; MANCHAND, P. S. The Structure of Nepetaefolin, a Perfuranoide Diterpene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 92, n. 18, p. 5527 – 5528, sep. 1970.

WHITE, J. D., MANCHAND, P. S. The structure of nepetaefolin, nepetaefurano and nepetaefuranol. **Journal Organic Chemistral**, v. 38, n. 4, p. 720, 1973.

WIESER, M.; DENNER, E. B. M.; KÄMPFER, P.; SCHUMANN, P.; TINDALL, B.; STEINER, U.; VYBIRAL, D.; LUBITZ, W.; MASZENAN, A.M.; PATEL, B. K. C.; SEVIOUR, R. J.; RADAX, C.; BUSSE, H. J. Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos *et al.* 1974). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, n. 52, p. 629–637, 2002.