

## ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE *Leonurus sibiricus* L.

Nilsa S.Y. Wadt\*  
Mitsuko T. Ohara\*  
Telma M. Sakuda-Kaneko\*  
Elfriede M. Bacchi\*

A espécie vegetal *Leonurus sibiricus* L. (Lamiaceae) é utilizada pela população brasileira para os mais diversos fins, principalmente como anti-inflamatória. No presente trabalho é estudada a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico a 70% liofilizado (extrato bruto) de *Leonurus sibiricus* L. O extrato foi testado frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*, pela determinação da concentração mínima inibitória, através do método de diluição em tubos. O extrato bruto de *Leonurus sibiricus* L. inibiu o crescimento de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

**Unitermos:** *Leonurus sibiricus* L., atividade antimicrobiana.

### 1. INTRODUÇÃO:

Alguns metabólitos secundários das plantas são úteis para a preservação da espécie, pois, afastam animais e microorganismos que podem provocar algum dano, ou podem atrair insetos ou pássaros, auxiliando na reprodução da espécie vegetal. Existem plantas que sintetizam, por exemplo, alcalóides tóxicos ou de gosto amargo para servirem como defesa contra herbívoros; glicosídeos cianogênicos contra moluscos; aminoácidos não proteicos, terpenos e flavonóides contra insetos predadores; isoflavonóides, diterpenos, cumarinas e poliacetilenos contra fungos. (8)

\* Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

Os flavonóides vêm sendo estudados com muita freqüência devido à variedade de efeitos farmacológicos, podendo-se citar: ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antiúlcera, antimalárica, inseticida, antioxidante, entre outras. (4,7,9,16,18)

*Leonurus sibiricus* L. pertence à família Lamiaceae, sendo que muitas espécies desta família estão sendo testadas em relação a sua atividade antimicrobiana, seja por seu óleo essencial ou pela presença de flavonóides. (13,16)

O objetivo do presente trabalho foi a verificação da ação antimicrobiana, visto o *Leonurus sibiricus* L. possuir óleo essencial e flavonóides.

A espécie em estudo tem como sinônimo popular: erva de Macaé, rubim, erva das lavadeiras, erva de São Francisco, cordão de frade, entre outras. (2,13)

É uma planta de cerca de um metro de altura, com caule e ramos quadrangulares, pubescentes, como as folhas e inflorescências; folhas opostas, simples, linear lanceoladas, de leve até profundamente trilobadas (tripartidas quando adultas), base longo cuneiforme, decurrente pelo pecíolo, lobos longo acuminados, os laterais, às vezes, apenas reduzidos e dentiformes; flores pequenas, axilares, sésseis e fasciculadas de róseas até avermelhadas, com lobos do cálice espiniformes. (2,13)

É originária da Ásia, onde tem sido usada medicinalmente para diversos fins terapêuticos, principalmente na terapia de disfunções ginecológicas. (11,14,15,19,23)

No Brasil a espécie adaptou-se muito bem tanto ao solo como ao clima podendo considerá-la brasileira; é utilizada popularmente contra males gastrintestinais, em tratamentos de bronquites e coqueluche e em algumas regiões, nos ataques de febre palustre. (1,2) Há também citações de uso como anti-reumático, contra contusões e feridas. (1,19) Popularmente, entretanto, o rubim é mais conhecido em nossa região como anti-inflamatório.

A presença de alcalóides, taninos, glicosídeos cardiotônicos, óleo essencial e resinas é relatada no gênero, sendo que os alcalóides, particularmente a leonurina, são os mais testados sob aspectos farmacológicos. (10,11,20,21,22,24)

### 2. MATERIAL E MÉTODOS:

– Preparação do extrato: (6)

As folhas de *Leonurus sibiricus* L., foram coletadas na chácara Wadt, Valinhos, estado de São Paulo, em maio de 1995.

A espécie foi identificada e registrada no herbário do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, sob número SPF 103580. As folhas foram secas em estufa com circulação de ar e temperatura de 40°C, até friagem e moídas, utilizando-se moinho de martelo até obtenção de pó semi-fino.

O extrato fluido foi preparado com a droga pulverizada, de acordo com o método C da Farm. Bras. II, utilizando-se como líquido extrator etanol a 70%.

Atividade antimicrobiana:<sup>(3,6,12,17)</sup>

**Microorganismos utilizados:**

<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 6538)
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 10536)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 9027)
<i>Candida albicans</i>	(ATCC 10231)
<i>Aspergillus niger</i>	(ATCC 16404)

**Melos de cultura:**

Caldo e ágar de caseína-soja  
Caldo e ágar de Sabouraud-dextrose

**Preparação dos melos de cultura:**

Os melos de caseína-soja (ágar e caldo) e Sabouraud-dextrose (ágar e caldo) foram preparados a partir do meio desidratado conforme as instruções do fabricante ( Difco ).

**Preparação e padronização das suspensões de microorganismos:**

A partir das culturas estoque, as bactérias foram repicadas em estrias na superfície do meio inclinado de ágar caseína-soja. A levedura e o fungo foram repicados na superfície do meio inclinado de ágar Sabouraud-dextrose. As bactérias foram incubadas a 30-35°C por 24 horas, bem como a levedura; o fungo a 25°C por 48 horas.

A massa celular resultante do crescimento, foi recolhida em nove mL de solução fisiológica estéril e a suspensão obtida foi submetida à contagem de microorganismos viáveis, pela técnica de semeadura em profundidade como segue.

Diluições decimais seriadas foram efetuadas em solução fisiológica estéril, a partir da suspensão original. Alíquotas de um mL da diluição 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-10</sup> das suspensões de bactérias e levedura; alíquotas de um mL da diluição 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-7</sup> do fungo, foram transferidas para placas de Petri, em duplicata, e homogeneizadas com cerca de 15 mL de meio de cultura esterilizado, ágar caseína-soja para bactérias e ágar Sabouraud-dextrose para a levedura e fungo. Após incubação das placas, durante 24 horas a 30-35°C, para bactérias e levedura e durante 48 horas a 25°C para fungo, efetuou-se a contagem de colônias.

O número de unidades formadoras de colônias ( UFC/ mL ) da suspensão original foi determinada, considerando-se a contagem das placas com cerca de 30 a 300 colônias.

A partir da suspensão original de cada microorganismo, de concentração conhecida, foram efetuadas diluições em solução fisiológica estéril até obtenção de suspensão com 10<sup>2</sup> UFC/mL.

**Preparação das soluções de antibióticos:**

Os padrões secundários de ampicilina anidra de potência 994 µg/mg e griseofulvina com potência de 1000 µg/mg foram utilizados para a preparação das soluções estoques com 1000 µg/mL, utilizando-se como solvente Dimetilsulfóxido (DMSO)/ salina (50:50).

Ambas as soluções padrão estoque foram mantidas em refrigerador e utilizadas por não mais que 2 dias.

**Preparação da amostra:**

Quantidade suficiente da amostra foi pesada para a obtenção da concentração de 0,5 mg/mL e 0,1 mg/mL do extrato bruto liofilizado de *Leonurus sibiricus* L. e diluída em DMSO/ salina (50:50).

**Determinação da atividade antimicrobiana:**

A inoculação dos microorganismos ( mo ) foi feita juntamente com o meio de cultura. Para isto, foi transferida alíquota de um mL da suspensão de cultura jovem com carga de 10<sup>2</sup> org/mL para nove mL do meio de cultura.

A incubação do meio de cultura contendo os microorganismos foi a 30-35°C por 24 horas para bactérias e levedura, já para o fungo a incubação foi a 25 °C por 120 horas; quando foi efetuada observação

macroscópica do crescimento microbiano. Três tubos foram utilizados para controle positivo ( meio + mo ), três tubos para controle negativo ( meio + mo + antibiótico ), três tubos para diluição da amostra 0,5 mg/mL ( meio + mo + amostra ), três tubos para diluição da amostra 0,1 mg/mL ( meio + mo + amostra ), três tubos com solvente ( meio + mo + solvente ).

Para controle negativo, foi utilizado padrão de ampicilina anidra, na concentração de 100 µg/mL para *E. coli*, 10 µg/mL para *S. aureus*, 185 µg/mL para *P. aeruginosa* e do padrão de griseofulvina, 350 µg/mL para *C. albicans* e para *Aspergillus niger* 600 µg/mL.

### 3. RESULTADOS:

Tabela 1: Ação do extrato hidroalcoólico a 70% de *Leonurus sibiricus* L sobre o crescimento microbiano.

	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>
Controle +	3+	3+	3+	3+	2+,1-
Controle -	3-	3-	3-	3-	3-
Am. 0,5mg/mL	3+	3-	3-	3+	3-
Am. 0,1mg/ml	3+	3+	3+	3+	1+,2-
Solvente	3+	3+	3+	3+	3+

- \* ( 3+ ) = 3 tubos com crescimento microbiano.
- ( 2+, 1- ) = 2 tubos com crescimento microbiano e 1 tubo sem crescimento.
- ( 1+, 2- ) = 1 tubo com crescimento microbiano e 2 tubos sem crescimento.
- ( 3- ) = 3 tubos sem crescimento microbiano.

Obs: Os testes foram repetidos e apresentaram os mesmos resultados.

### 4. DISCUSSÃO:

*Leonurus sibiricus* L., rubim, é uma espécie vegetal bastante utilizada pela população, para os mais diversos fins. Em função dos grupos de princípios ativos presentes, foi inicialmente testada a ação antimicrobiana.

Nos ensaios realizados, o extrato bruto de *Leonurus sibiricus* L. inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, sendo a concentração mínima inibitória menor que 0,5 mg/mL e maior que 0,1 mg/mL.

### SUMMARY:

The present study evaluated the antimicrobial activity of the 70% hydroalcoholic extract from *Leonurus sibiricus* L., Lamiaceae. The antimicrobial activity was determined through the minimum inhibitory concentration ( MIC ). The extract of *Leonurus sibiricus* L. was active against *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. COIMBRA, R. *Notas de fitoterapia*. 2. ed. Rio de Janeiro: Laboratório Clínico Silva Araújo, 1958.
2. CORREA, M.P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*, Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.4, pt.1, 1969.
3. DAVINO, S.C. *Estudo in vitro da atividade antifúngica e antibacteriana de extratos de plantas brasileiras da família Compositae (Asteraceae) e de alguns de seus constituintes*, Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.
4. DUKE, J.A. *Handbook of medicinal herbs*, 6. ed. Boca Raton: CRC Press, 1988.
5. FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2. ed. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira, 1959, 1265 P.
6. GIESBRECHT, A.M. *Atividade antibiótica de produtos naturais*, Dissertação de Livre-Docência, Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo, São Paulo, 1980.
7. HARBORNE, J.B. *Phytochemical methods*, 2. ed. London: Chapman and Hall, 1973.
8. HARBORNE, J. B. *Introduction to ecological biochemistry*, London: Academic Press, 1977.
9. JOVANOVIĆ, S.V., STEENKEN, S., TOSIĆ, M., SIMIĆ, M.G., MAYANOVIĆ, B. Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v. 116, p. 4846-4851, 1994.

10. KARPOVICH, V. N. Preliminary investigation of plants found in Eastern recipes used in cardiovascular disease. *FarmatsevtInst.*, v. 12, p. 195-200, 1961.
11. KUBOTA, S.; NAKASHIMA, S. The study of *Leonurus sibiricus* L. II. Pharmacological study of alkaloid "leonurin" isolated from *Leonurus sibiricus* L. *Folia Pharmacol.*, v. 11 n. 2, p. 159-67, 1930.
12. MATSUNAGA, C.K., IZUMISAWA, C.M., SAKUDA, T.M., OHARA, M.T., KATO, M.J. Determinação de atividade antimicrobiana de lignanas. *1<sup>st</sup> International Symposium of Latin American and Caribbean Section AOAC International*. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, Brasil, 1995.
13. MOREIRA, H. F. Contribuição ao estudo da *Leonurus sibiricus* L. *Trib. Farm.*, Curitiba, v. 11, 1957.
14. NAGASAWA, H., SUZUKI, M., IMATOMI, H. HIBINO, A., YAMAMURO, Y., SENSUI, N. Restoration by motherwort (*Leonurus sibiricus* L.) of lactation suppressed by pregnancy - dependent mammary tumors in GR/A mice. *Asian - Aust. Animal Sci.*, n. 1, p. 15-20, 1991.
15. NAGASAWA, H., INATOMI, H., SUZUKI, M., MORI, T. Further study on the effects of motherwort (*Leonurus sibiricus* L.) on preneoplastic and neoplastic mammary gland growth in multiparous GR/A mice. *Anticancer Res.*, Athens, v.12, n. 1, p. 141-143, 1992.
16. PATHAK, K., SIGLA, H. K. Flavonoids as medicinal agents, recent advances. *Fitoterapia*, Milan, v. 5, 371-389, 1991.
17. ROJAS, A., HERNANDES, L., MIRANDA, R.P., MATA, R. Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexical medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 35, nº 3, p. 275-283, 1992.
18. SANTOS, D.F., SARTI, S.J., BASTOS, J.K., LEITÃO, H.F.F. MACHADO, J.O., ARAUJO, M.L.C., LOPES, W.D., ABREU, J.E. Atividade antibacteriana de extratos vegetais. *Rev. Ciênc. Farm.*, Araraquara, v. 12, p. 47-69, 1990.

19. SHI, M., CHANG, L., HE, G. Research on the stimulating action of *Carthamus tinctorius* L., *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels and *Leonurus sibiricus* L. on uterus. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*. v. 20, n. 3, p. 173-175, 192, 1995.
20. SHIN, S. H. Studies on active principles of *Leonurus sibiricus* *Saengyak Hakhoe Chi*, v. 15, p.104-107, 1956.
21. SUGIURA, S., INONE, S., HAYASHI, Y., KISHI, Y., GOTO, T. Structure and synthesis of leonurine. *Tetrahedron*, Oxford, v.25, n. 21, p. 5155-61, 1969.
22. TENG, H. T., CHI, W. H. The chemical constituents of chinese drug i-mutsao. *J. Chinese Chem. Soc.*, Peking, v. 7, p. 105-110, 1940.
23. YU, C. F. Studies on the chemical constituents of chinese tradicional medicine I-Mu-Tsao. *Hua Hsueh Hsuh*, Peking, v. 89, p. 84-96, 1981.
24. ZHELNOV, I. I., GRAZHDAN, A. K. The active substances of Siberian motherwort. *Alkaloids. Farmatsevt Kak.*, p. 128-131, 1962.