

CATARINA PEREIRA LEITE TEODÓSIO

**PESQUISA DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
EXTRATOS DE *PLECTRANTHUS HADIENSIS*, *P.*
INFLEXUS, *P. LIPPIO*, *P. WELSHII* E *P.*
*MZUBULENSIS***

Orientadora: Prof^ª. Doutora Patrícia Dias Mendonça Rijo

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

**Lisboa
2019**

CATARINA PEREIRA LEITE TEODÓSIO

**PESQUISA DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
EXTRATOS DE *PLECTRANTHUS HADIENSIS*, *P.*
INFLEXUS, *P. LIPPIO*, *P. WELSHII* E *P.*
*MZUBULENSIS***

Dissertação defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias no
dia 24/04/2020, perante o júri, nomeado pelo Despacho de
Nomeação nº: 43/2020, de 12 de Fevereiro de 2020, com
a seguinte composição:

Presidente:

Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente:

Prof^a. Doutora Margarida Madureira

Orientadora:

Prof^a. Doutora Patrícia Dias Rijo

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde**

Lisboa

2019

Em cada medicamento que alivia as dores da
humanidade, está a ciência do farmacêutico

Autor desconhecido

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha orientadora, Prof^a. Dr^a Patrícia Rijo, toda a disponibilidade e ajuda prestadas durante a realização do trabalho e que tornou possível a existência de publicações de artigos científicos, e por me ter sempre incentivado e acreditado em mim desde os tempos de licenciatura, para que escolhesse as unidades curriculares de Projeto e me iniciasse no mundo da investigação.

À ECTS, por me ter concedido uma das bolsas PADDIC no ano letivo 2016/2017, que ajudou e contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho.

À Catarina Garcia, por ter sido a primeira pessoa que me orientou dentro do laboratório e cuja ajuda, simpatia e grande paciência se tornaram indispensáveis para a realização de todo este trabalho, pois muitas vezes sem os seus esclarecimentos e conhecimento não teria sido possível continuar.

À Epole Ngolle Ntungwe, pela sua enorme paciência, simpatia e ajuda preciosa para continuar o meu trabalho quando não pude estar presente, por me ter recebido de braços abertos neste seu/meu projeto e pela orientação e explicação de uma grande parte da metodologia do trabalho.

À Prof^a. Dr^a Lucília Saraiva, pela parceria feita com o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

A todos os meus amigos, especialmente Catarina, Miguel e Rita que me acompanharam desde os meus tempos de infância e pelos bons momentos partilhados.

Às minhas grandes amigas e colegas de faculdade, que me acompanharam durante todo este percurso, Carolina, Cláudia e Raquel, cujo companheirismo, boa disposição e ajuda, também se tornaram indispensáveis para a concretização deste projeto.

Aos meus animais, Migalhas, Zé Quilão, Pippa, Marie e Faustina, pelas lambidelas, arranhadelas, companhia e principalmente lealdade, que foram cruciais para continuar a acreditar que conseguiria chegar ao fim.

Aos meus avós, já não presentes, e aos meus pais, a quem devo a concretização deste sonho, e cuja compreensão nas horas mais difíceis e muito sacrifício pessoal, financeiro e total dedicação, tornaram possível a chegada ao fim de uma das etapas mais importantes da minha vida.

Lista de publicações

Alguns dos resultados descritos nesta dissertação foram apresentados em vários congressos ou em publicações em painel, e publicados em revistas científicas.

Artigos científicos

Ntungwe, E. N., Marçalo, J., Garcia, C., Reis, C., **Teodósio, C.**, Oliveira, C., et al., (2017). Biological activity screening of seven *Plectranthus* species. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 14(1), 95–108. <https://doi.org/10.19277/BBR.14.1.153>.

Garcia, C., **Teodósio, C.**, Oliveira, C., Oliveira, C., Díaz-lanza, A., & Reis, C. (2018). Naturally Occurring *Plectranthus*- derived Diterpenes with Antitumoral Activities. *Current Pharmaceutical Design*, 24(36), 4207-4236(30). <https://doi.org/10.2174/1381612825666190115144241>.

Ntungwe, E. N., Bessa, C., Garcia C., **Teodósio, C.**, Oliveira, C., Oliveira, C., et al., (2018). *7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone* from *Plectranthus ramosior*: a screening study for anticancer lead molecules. *Planta medica*, *Em submissão*.

Macedo, A., Filipe, P., Thomé, N. G., Vieira, J., Oliveira, C., **Teodósio, C.**, et al., (2020). A Brief Overview of the Oral Delivery of Insulin as an Alternative to the Parenteral Delivery. *Current Molecular Medicine*, 20, 1–10. <https://doi.org/10.2174/1566524019666191010095522>.

Publicações em painel nacionais

Catarina Garcia, **Catarina Teodósio**, Beatriz Janeiro, Catarina Reis, Patrícia Rijo, “Academic assessment of antimicrobial and antioxidant properties of ethanolic extracts from *Plectranthus madagascariensis*”; II Jornadas CBIOS, 12 Outubro, Lisboa, Portugal, 2016.

Catarina Teodósio, Carolina Oliveira, Cláudia Oliveira, Epole Ngolle Ntungwe, Joana M. Andrade, Vera Isca, Patrícia Rijo, “*Plectranthus* species as a source for anticancer lead molecules”; 13º Congresso das Farmácias (ANF), 19 Outubro, Lisboa, Portugal, 2018.

Carolina Oliveira, **Catarina Teodósio**, Cláudia Oliveira, Marisa Nicolai, Paula Pereira, Amílcar Roberto, Patrícia Rijo, “Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants”; 13º Congresso das Farmácias (ANF), 19 Outubro, Lisboa, Portugal, 2018.

Epole Ngolle Ntungwe, Carolina Oliveira, **Catarina Teodósio**, Vera Isca, Patrícia Rijo, “Bio-guided fractionation and isolation study of bioactive components from *Plectranthus mutabilis* Codd”; 1ª Conferência sobre Investigação em Produtos Naturais e Avícolas-Iniciativa conjunta CBIOS-CYTED, 8-9 Novembro, Lisboa, Portugal, 2018.

Publicações em painel internacionais

Henrique Silva, Epole Ngolle Ntungwe, Joana Marçalo, Catarina Garcia, Catarina Reis, **Catarina Teodósio**, Carolina Oliveira, Cláudia Oliveira, Luís Rodrigues, Patrícia Rijo, “Estimation of acetylcholinesterase inhibition, antioxidant, antimicrobial activities and brine shrimp toxicity of seven *Plectranthus* species”; International Federation Congress (FIP), Estocolmo, Suécia, 2017.

Epole Ngolle Ntungwe, Joana Marçalo, Catarina Garcia, Catarina Reis, **Catarina Teodósio**, Carolina Oliveira, Cláudia Oliveira, Amílcar Roberto, Patrícia Rijo, “Biological activity screening of seven *Plectranthus* species: anticancer lead molecule search” (P5); Training School COST Action CM1407, 18-20 Setembro, Lisboa, Portugal, 2017.

Proceeding nacional

Catarina Garcia, **Catarina Teodósio**, Beatriz Janeiro, Catarina Reis, Patrícia Rijo, “Academic assessment of antimicrobial and antioxidant properties of ethanolic extracts from *Plectranthus madagascariensis*”, *Biomed Biopharm Res.*, 2016; (13) 2:, 273-290.

Proceeding internacional

Epole Ngolle Ntungwe, Joana Marçalo, Catarina Garcia, Catarina Reis, **Catarina Teodósio**, Carolina Oliveira, Cláudia Oliveira, Amílcar Roberto, Patrícia Rijo, “Biological activity screening of seven *Plectranthus* species: anticancer lead molecule search” (P10); 4th Meeting of COST Action CM1407, 21-22 Setembro, Lisboa, Portugal, 2017.

Suplemento

Epole Ngolle Ntungwe, Joana Marçalo, Catarina Garcia, Catarina Reis, **Catarina Teodósio**, Carolina Oliveira, Cláudia Oliveira, Amílcar Roberto, Patrícia Rijo, “Biological activity screening of seven *Plectranthus* species: anticancer lead molecule search”, *Biomed Biopharm Res.*, 2017; (14) 2:, 253-286. <https://doi.org/10.19277/bbr.14.2.168>.

Resumo

Neste trabalho, estudaram-se as atividades antioxidante, antimicrobiana e letalidade em *Artemia salina*, de cinco espécies do género *Plectranthus* (*P. hadiensis*, *P. inflexus*, *P. lippio*, *P. welshii* e *P. mzubulensis*). Para o extrato mais bioativo, *P. hadiensis*, realizaram-se ensaios de inibição *in vitro* da acetilcolinesterase, citotoxicidade, avaliação da atividade antimicrobiana, fracionamento, isolamento e identificação de um composto bioativo.

O extrato de *P. hadiensis* apresentou o maior rendimento de extração (13,49% m/m). A atividade antimicrobiana foi avaliada contra bactérias Gram-positivas, negativas e leveduras pelo método de difusão em poços (zonas de inibição contra *S. aureus* - 15 mm e *C. albicans* - 11 mm) e pelo método de microdiluição (valores de CMI para *S. aureus* e *S. aureus*-CIP106760 de 15,62 e de 3,91 µg/mL, respetivamente). A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de DPPH (36,24%) e a toxicidade geral num modelo de *Artemia salina* (CL_{50} = 0,880 mg/L). A inibição da acetilcolinesterase foi de 19,98% e a citotoxicidade foi avaliada em três linhas celulares humanas (HCT116 = $3,45 \pm 0,35$; MCF-7 = $2,90 \pm 0,10$; NCI-H460 = $3,00 \pm 0,10$ µg/mL).

Um estudo fitoquímico bioguiado foi realizado e originou o isolamento e caracterização espectroscópica de 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, que é o potencial responsável pela bioatividade.

Palavras-chave: *Plectranthus*, Acetilcolinesterase, Antioxidante, Toxicidade, Antimicrobiana

Abstract

In this work, the antioxidant and antimicrobial activities and lethality in *Artemia salina*, of five *Plectranthus* genus species (*P. hadiensis*, *P. inflexus*, *P. lippio*, *P. welshii* and *P. mzubulensis*), were studied. For the most bioactive extract, *P. hadiensis*, were performed *in vitro* inhibition assays of acetylcholinesterase, cytotoxicity, antimicrobial activity evaluation, fractionation, isolation and identification of one bioactive compound.

P. hadiensis extract showed the highest extraction yield (13,49% m/m). The antimicrobial activity was evaluated against Gram- positive and negative bacteria and yeasts with the well-difusion method (inhibition zones against *S. aureus*- 15 mm and *C. albicans*- 11 mm) and with the microdilution test (MIC values to *S. aureus* and *S. aureus*-CIP106760 of 15,62 and 3,91 $\mu\text{g/mL}$, respectively). The antioxidant activity was evaluated with DPPH method (36,24%) and general toxicity in an *Artemia salina* model (LC_{50} = 0,880 mg/L). The acetylcholinesterase inhibition was 19,98% and cytotoxicity was evaluated in three human cell lines (HCT116 = $3,45 \pm 0,35$; MCF-7 = $2,90 \pm 0,10$; NCI-H460 = $3,00 \pm 0,10$ $\mu\text{g/mL}$).

A bioguided phytochemical study was performed and it led to the isolation and spectroscopical characterization of 7 α -acetoxy-6 β -hidroxyroyleanone, that is the potential responsible for the bioactivity.

Keywords: *Plectranthus*, Acetylcholinesterase, Antioxidant, Toxicity, Antimicrobial

Abreviaturas e símbolos

%	Porcentagem
% (m/m)	Porcentagem massa por massa
% (m/v)	Porcentagem massa por volume
% (v/v)	Porcentagem volume por volume
®	Marca Registada
¹³ C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
¹ H-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogénio
AA	Atividade antioxidante
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AINES	Anti-Inflamatórios Não Esteróides
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butilhidroxitolueno
BuCh	Butirilcolina
BuChE	Butirilcolinesterase
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CCF	Cromatografia de Camada Fina
CCFP	Cromatografia de Camada Fina Preparativa

CDCl ₃	Clorofórmio Deuterado
CI ₅₀	Concentração Inibitória Média
CIP	<i>Collection of Institute Pasteur</i>
CL ₅₀	Concentração Letal Média
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetro
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMF	Concentração Mínima Fungicida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
Con A	Concanavalina A
COX	Ciclooxigenase
DA	Doença de Alzheimer
DL ₅₀	Dose Letal Média
DMAPP	Dimetilalil Pirofosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazina
DTNB	5,5'-Dithiobis (Ácido 2-Nitrobenzóico) ou Reagente de Ellman
DXP	1-Desoxilulose-5-Fosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ERO	Espécies Reativas de Oxigénio
ERV	<i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina

EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPP	Farnesil Pirofosfato
g	Grama
GGPP	Geranilgeranil Pirofosfato
GPP	Geranil Pirofosfato
H ₂ SO ₄ /MeOH	Ácido Sulfúrico/Metanol
HCl	Ácido Clorídrico
IL-2	Interleucina 2
iNOS	Óxido Nítrico Sintase
IPP	Isopentenil Pirofosfato
K ₂ Cr ₂ O ₇	Dicromato de Potássio
LOX	Lipooxygenase
LPS	Lipopolissacarídeo
mg/mL	Miligramma por mililitro
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
nm	Nanómetro

NO	Óxido Nítrico
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. hadiensis</i>	<i>Plectranthus hadiensis</i>
<i>P. inflexus</i>	<i>Plectranthus inflexus</i>
<i>P. lippio</i>	<i>Plectranthus lippio</i>
<i>P. mzubulensis</i>	<i>Plectranthus mzubulensis</i>
<i>P. ramosior</i>	<i>Plectranthus ramosior</i>
<i>P. welshii</i>	<i>Plectranthus welshii</i>
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à metacilina
SARV	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à vancomicina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SRB	Sulforodamina B
TBMR	Tuberculose multirresistente
TCA	Ácido Tricloroacético
α	Alfa
β	Beta
δ	Delta

µg/mL Micrograma por mililitro

µL Microlitro

°C Graus Celsius

Índice Geral

Índice de Tabelas	15
Índice de Figuras	16
Introdução	19
1. Plantas medicinais como fonte de descoberta de novos fármacos	20
2. Terpenóides	21
3. O género <i>Plectranthus</i> L' Hérít	26
3.1 Classificação Taxonómica	29
3.2 <i>Plectranthus inflexus</i>	32
3.2.1 Diterpenóides isolados de <i>P. inflexus</i>	33
3.2.2 Atividade biológica dos diterpenos abietanos de <i>P. inflexus</i>	34
3.2.3 Atividade biológica dos diterpenos <i>ent</i> -cauranos de <i>P. inflexus</i>	35
3.3 <i>Plectranthus hadiensis</i>	37
3.3.1 Diterpenóides isolados de <i>P. hadiensis</i>	39
3.3.1.1 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona	40
3.3.1.2 7 β -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona	42
3.3.1.3 6 β ,7 β -dihidroxiroileanona	44
3.3.1.4 7 α -formiloxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona e 7 α -acetoxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona	45
4. Atividades biológicas de <i>Plectranthus</i>	48
4.1 Atividade antioxidante	48
4.2 Atividade antimicrobiana	50
4.3 Atividade antitumoral	53
4.4 Atividade inibitória da AChE	55
Capítulo I: Parte experimental	58
1.1 Reagentes	59
1.2 Materiais e equipamentos	59
1.3 Material vegetal	60
1.4 Microrganismos e linhas celulares	60
1.5. Métodos	61
1.5.1 Preparação de extratos e rendimento de extração	61
1.5.2 Atividade antioxidante	62
1.5.2.1 Ensaio qualitativo	62
1.5.2.2 Ensaio quantitativo	63

1.5.3	Atividade antimicrobiana.....	64
1.5.3.1	Método de difusão em poços.....	64
1.5.3.2	Método de microdiluição (avaliação dos valores de CMB, CMF e CMI).....	65
1.5.4	Toxicidade geral- ensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i>	66
1.5.5	Citotoxicidade	67
1.5.6	Ensaio de inibição da AChE <i>in vitro</i>	68
1.5.7	Estudo fitoquímico do extrato bioativo de <i>P. hadiensis</i>	69
Capítulo II: Resultados e Discussão		70
2.1	Preparação de extratos e rendimento de extração.....	71
2.2	Atividade antioxidante.....	73
2.2.1	Ensaio qualitativo.....	73
2.2.2	Ensaio quantitativo.....	74
2.3	Atividade antimicrobiana.....	76
2.3.1	Método de difusão em poços.....	76
2.3.2	Método de microdiluição (avaliação dos valores de CMB, CMF e CMI).....	78
2.4	Toxicidade geral- ensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i>	80
2.5	Citotoxicidade	84
2.6	Ensaio de inibição da AChE <i>in vitro</i>	87
2.7	Estudo fitoquímico do extrato bioativo de <i>P. hadiensis</i>	89
Conclusão		95
Bibliografia.....		98
Anexos		I
Anexo I: Artigo de revisão- Naturally Occurring <i>Plectranthus</i> -derived Diterpenes with Antitumoral Activities		II
Anexo II: Espectro de ¹³ C-RMN do composto 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona		XXXII

Índice de Tabelas

Tabela 1- Classificação taxonómica atual do género <i>Plectranthus</i> , a sua distribuição geográfica, habitat e características morfológicas de diagnóstico.	31
Tabela 2- Informação resumida sobre <i>P. inflexus</i> , quais os seus compostos com atividade biológica, o tipo de atividade biológica e o mecanismo de ação que se pensa ser o responsável por essa mesma atividade.	36
Tabela 3- Informação resumida sobre <i>P. hadiensis</i> , quais os seus compostos com atividade biológica, o tipo de atividade biológica e o mecanismo de ação que se pensa ser o responsável por essa mesma atividade.	47
Tabela 4- Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do extrato acetónico de <i>P. hadiensis</i> em linhas celulares HCT116, MCF-7 e NCI-H460. a : controlo positivo doxorrubicina; b : controlo positivo paclitaxel; *(Matias et al., 2019).	86
Tabela 5- Massas finais das frações A, B e C resultantes do processo de CCFP.	90
Tabela 6- Massas finais das frações F1, F2, F3 e F4 resultantes do processo de CCFP.	93

Índice de Figuras

Figura 1- Representação das duas vias metabólicas referentes à síntese de terpenos/terpenóides: via do mevalonato e do 1-desoxilulose-5-fosfato (DXP). * IPP ou DMAPP . IPP : isopentenil pirofosfato; DMAPP : dimetilalil pirofosfato. GPP : geranil pirofosfato; FPP : farnesil pirofosfato; GGPP : geranilgeranil pirofosfato (Felipe & Bicas, 2017).	22
Figura 2- Representação da via metabólica de formação dos tipos de diterpenos mais comuns (Rijo, 2010, p.12).	24
Figura 3- Esqueletos dos derivados de abietano encontrados no género <i>Plectranthus</i> . 17(15 → 16) <i>abeoabietano</i> (a), 17(15 → 16) <i>abeotriptolidano</i> (b), 13(16)- ciclopropilabietano (c) e 13(16)- ciclopropilriptolidano (d) (Rijo, 2010, p.14).	25
Figura 4- Folhas típicas das espécies de <i>Plectranthus</i> (Pasoski, 2009, p.18).	26
Figura 5- Flores típicas das espécies de <i>Plectranthus</i> (Pasoski, 2009, p.18).	27
Figura 6- Representação da classificação taxonómica atual do género <i>Plectranthus</i>	30
Figura 7- Folhas de <i>P. inflexus</i> (fonte: http://flowers.la.coocan.jp/Lamiaceae/Isodon%20inflexus.htm , consultado em 13/06/2018).	32
Figura 8- Flores de <i>P. inflexus</i> (fonte: http://flowers.la.coocan.jp/Lamiaceae/Isodon%20inflexus.htm , consultado em 13/06/2018).	32
Figura 9- Estruturas químicas dos diterpenos abietanos isolados de <i>P. inflexus</i> . Inflexanina C (a), Inflexanina D (b), Inflexusida A (c) e Inflexusida B (d) (Xie et al., 2012).	33
Figura 10- Estruturas químicas dos diterpenos <i>ent</i> -cauranos isolados de <i>P. inflexus</i> . Inflexanina B (a) e Inflexinol (b) (Lee et al., 2007; Lim et al., 2013).	33
Figura 11- Folhas de <i>P. hadiensis</i> (fonte: https://www.inaturalist.org/observations/11301258 , consultado em 08/06/2018).	37
Figura 12- Flores de <i>P. hadiensis</i> (fonte: https://www.inaturalist.org/observations/11301258 , consultado em 08/06/2018).	37
Figura 13- Estrutura química de uma roileanona (Ladeiras et al., 2016).	39
Figura 14- Estrutura química de 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (Ladeiras et al., 2016). ...	40
Figura 15- Estrutura química de 7 β -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (Kubínová et al., 2014). ..	42
Figura 16- Estrutura química de 6 β ,7 β -dihidroxiroileanona (Kubínová et al., 2014).	44
Figura 17- Estrutura química de 7 α -formiloxi-6,12-dihidroxabieta-8,12-diene-11,14-diona (Garcia et al., 2018).	45

Figura 18- Estrutura química de 7 α -acetoxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona (Garcia et al., 2018).....	45
Figura 19- Estrutura química do paclitaxel (Garcia et al., 2018).	53
Figura 20- Estruturas químicas da tacrina (a) e da rivastigmina (b) (Rijo, 2010, p.42).....	55
Figura 21- Diferentes fases de preparação dos extratos e respetivo processo de extração (captado em 25/10/2016).	61
Figura 22- Resultados obtidos para o rendimento de extração (resíduo seco % m/m) das cinco espécies de <i>Plectranthus</i> em estudo.....	72
Figura 23- Reação do radical livre DPPH com um antioxidante (Rijo, 2010, p.152).....	73
Figura 24- Resultados obtidos para a atividade antioxidante dos cinco extratos de <i>Plectranthus</i> em estudo.....	75
Figura 25- Resultados obtidos para a atividade antimicrobiana dos cinco extratos de <i>Plectranthus</i> em estudo.....	77
Figura 26- Resultados obtidos para os valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$), CMB ($\mu\text{g/mL}$) e CMF ($\mu\text{g/mL}$) para o extrato acetónico de <i>P. hadiensis</i> . C. pos.: Controlo positivo; C. neg.: Controlo negativo.	79
Figura 27- Resultados obtidos da pesquisa de atividade de cinco extratos de espécies de <i>Plectranthus</i> para toxicidade, à concentração de 10 mg/L, usando o ensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i>	82
Figura 28- Resultado obtido para o valor de CL ₅₀ para o extrato de <i>P. hadiensis</i> (0,880 mg/L), testado às concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/L.....	82
Figura 29- Resultado obtido para o valor de CL ₅₀ para o extrato de <i>P. inflexus</i> (0,986 mg/L), testado às concentrações de 0,1; 0,5 e 1 mg/L.....	83
Figura 30- Reação química da deteção da atividade da AChE pelo método de Ellman (Rijo, 2010, p.155).	87
Figura 31- Resultados obtidos para a percentagem de inibição da AChE para o extrato de <i>P. hadiensis</i>	88
Figura 32- Placas de CCF após eluição e antes do fracionamento, visualizadas à luz visível e respetiva revelação a 254 e 366 nm (captado em 05/04/2017).	89
Figura 33- Placa de CCF para as três frações A, B e C, após o fracionamento e após eluição visualizada à luz visível, e respetiva revelação a 254 nm e 366 nm (captado em 05/04/2017).	90
Figura 34- Placa de CCF para as três frações A, B e C, após o fracionamento e após eluição visualizada à luz visível, e respetiva revelação com H ₂ SO ₄ /MeOH a 254 nm e 366 nm (captado em 05/04/2017).	90

Figura 35- Resultados obtidos para a atividade antimicrobiana do extrato de <i>P. hadiensis</i> e das frações A, B e C em estudo.....	91
Figura 36- Observação da mudança de coloração e seleção das frações 1, 2, 3 e 4 (F1, F2, F3 e F4) com interesse a separar (captado em 16/02/2018).	92
Figura 37- Aspeto final das frações F1, F2, F3 e F4 após o processo de desadsorção da sílica (captado em 16/02/2018).	92
Figura 38- Placa de CCF para as quatro frações F1, F2, F3 e F4, após eluição visualizada à luz visível, e a 254 nm e 366 nm, respetivamente (captado em 20/02/2018).	93
Figura 39- Espectro de ¹ H-RMN para o composto presente na fração F2, onde é possível identificar a presença de um diterpeno abietano (Ntungwe et al., 2018).	94
Figura 40- Espectro de ¹³ C-RMN do composto isolado da fração F2, 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, após fracionamento do extrato de <i>P. hadiensis</i> (Ntungwe et al., 2018).	XXXII

Introdução

1. Plantas medicinais como fonte de descoberta de novos fármacos

As plantas são uma fonte importante na obtenção de novos medicamentos, sendo que muitos destes, bastante recentes, são derivados dos seus metabolitos secundários ou preparados a partir deles, como derivados semissintéticos e sintéticos para uso clínico (Rijo, 2010, p.3; Topcu & Ulubelen, 2007).

Os metabolitos secundários de plantas têm uma longa história de uso como medicamentos, como por exemplo, o ópio, a digoxina e a vinblastina. Segundo a OMS, aproximadamente um quarto dos fármacos usados nos Estados Unidos derivam de plantas, o que confirma que a química de produtos naturais é um campo de pesquisa muito interessante e promissor (Pasoski, 2009, p.21). Considerando o mercado dos medicamentos utilizados para o tratamento do cancro, numa análise realizada na América do Norte, Europa e Japão durante o período de 1981-2006, foi revelado que 47,1% de um total de 155 destes medicamentos clinicamente aprovados, eram produtos naturais não modificados ou seus derivados semissintéticos, ou moléculas sintetizadas baseadas em farmacóforos de produtos naturais. Aproximadamente um quarto dos medicamentos mais vendidos no mundo entre 2001 e 2002, eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais (Pan, Chai, & Kinghorn, 2010; Rijo, 2010, p.2).

Hoje em dia, em alguns países asiáticos e africanos, na sua maioria em desenvolvimento, cerca de 80% da população depende da medicina tradicional para os seus cuidados de saúde primários. A população de muitos países desenvolvidos tem usado alguma forma de medicina alternativa ou complementar, onde se enquadram os tratamentos à base de plantas que, para além de muito populares na medicina tradicional, são também muito rentáveis a nível económico (Matu & Van Staden, 2003; Pasoski, 2009, p.21).

Nas últimas décadas, as plantas mais usadas na medicina tradicional têm sido objeto de estudos farmacológicos muito intensos, e vários compostos conhecidos e isolados destas plantas já demonstraram atuar em alvos moleculares recém-validados. Recentemente, tem havido um interesse renovado na pesquisa de produtos naturais, muito devido ao fracasso dos métodos alternativos de descoberta de fármacos, de modo a se conseguir descobrir e fornecer compostos de atuação eficaz em áreas terapêuticas chave, como imunossupressão, anti-infecciosos e doenças metabólicas (Butler, 2004; Rijo, 2010, p.3). Uma vez que os produtos naturais são tipicamente isolados em pequenas quantidades, que são insuficientes para a otimização e desenvolvimento de fármacos, considera-se então que para a sua descoberta a partir de plantas medicinais, é necessária a colaboração com químicos sintéticos, uma vez que os produtos naturais isolados permanecem um componente essencial na busca de novos medicamentos (Balunas & Kinghorn, 2005; Rijo, 2010, p.3).

2. Terpenóides

Tal como a *Mentha piperita* e a *Salvia officinalis*, as espécies de *Plectranthus* pertencem a um grupo de plantas com características aromáticas, que lhes são conferidas pela sua rica produção de óleos essenciais (Rice, Brits, Potgieter, & Staden, 2011). Devido à sua natureza volátil e lipofílica, os óleos essenciais podem ser facilmente absorvidos pelo corpo humano através do sistema respiratório ou da pele. Uma vez absorvidos, têm a capacidade de se ligar às moléculas-alvo, sendo que diferentes constituintes de um óleo essencial podem ter diferentes moléculas-alvo e, portanto, diferentes atividades, o que poderá torná-lo muito interessante no sentido terapêutico, já que consegue exercer vários efeitos simultaneamente (Pasoski, 2009, p.22-23). Os óleos essenciais são metabolitos secundários, que para além de serem muito utilizados na indústria cosmética e culinária (Hussein, 2018; Waldia, Joshi, Pathak, & Joshi, 2011), são muitas vezes responsáveis por conferir proteção à planta contra microorganismos e outros agentes como os animais herbívoros e por atrair agentes polinizadores, mas o seu mecanismo de ação e os seus efeitos terapêuticos ainda não foram bem investigados (Pasoski, 2009, p.22-23).

Estes metabolitos possuem na sua composição, compostos com atividade biológica, os terpenos. Quimicamente, os terpenos podem ser definidos como 'alcenos naturais', isto é, apresentam uma dupla ligação carbono-carbono sendo caracterizados como hidrocarbonetos insaturados, mas por outro lado, se um terpeno contém oxigénio, o mesmo é denominado de terpenóide (Felipe & Bicas, 2017). Apesar de apresentarem diferenças estruturais entre si, todos os terpenos/terpenóides são basicamente estruturados em blocos de cinco carbonos, unidades de isopreno (C_5H_8), normalmente ligadas entre si pela ordem 'cabeça-a-cauda' (ligação 1-4), o que caracteriza a chamada regra do isopreno (Felipe & Bicas, 2017). Esta derivação da estrutura química em unidades de cinco carbonos, comum aos terpenos, é resultado da sua origem bioquímica, já que todos os seus carbonos são provenientes do isopentenil pirofosfato (IPP) ou do seu isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Estes últimos, por meio de duas rotas metabólicas distintas- via do mevalonato e via do 1-desoxilulose-5-fosfato (DXP)- originam os diferentes terpenos, e portanto, através da primeira via biossintética originam-se os sesqui- e triterpenos que possuem três e seis unidades de isopreno, e da segunda via, os mono- e diterpenos, possuindo duas e quatro unidades de isopreno, respetivamente (**Figura 1**) (Felipe & Bicas, 2017; Kitaoka, Lu, Yang, & Peters, 2015; Pasoski, 2009, p.22-25).

Desta forma, os terpenos podem ser classificados de acordo com a quantidade de unidades de isopreno que a sua estrutura possui. Os terpenos possuem estruturas típicas contendo esqueletos de carbono representados por $(C_5)_n$, onde n corresponde ao número de

unidades de isopreno, sendo classificados como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). Além desta classificação, os terpenos podem ser subclassificados em termos do grau de ciclização do núcleo da molécula, através do geranilgeranil pirofosfato (GGPP), ou seja, como acíclicos ou lineares (moléculas abertas), bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos e macrocíclicos (Felipe & Bicas, 2017; Garcia et al., 2018). Citando alguns exemplos, dentro dos terpenóides acíclicos estão os fitanos. Nos bicíclicos, encontram-se os labdanos, halimanos e clerodanos, e dentro dos tricíclicos estão os abietanos e primaranos. Nos tetracíclicos estão presentes os beieranos e os cauranos, e por fim, nos pentacíclicos e macrocíclicos encontram-se os taxanos e cembranos (Garcia et al., 2018; Hanson, 2009).

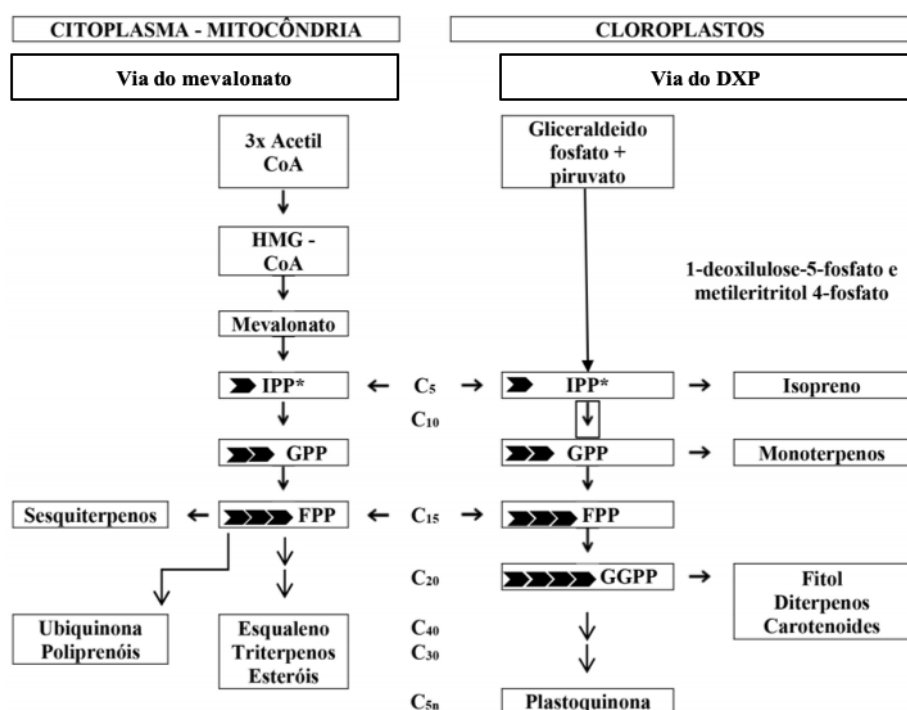


Figura 1- Representação das duas vias metabólicas referentes à síntese de terpenos/terpenóides: via do mevalonato e do 1-desoxilulose-5-fosfato (DXP). *IPP ou DMAPP. IPP: isopentenil pirofosfato; DMAPP: dimetilalil pirofosfato. GPP: geranil pirofosfato; FPP: farnesil pirofosfato; GGPP: geranilgeranil pirofosfato (Felipe & Bicas, 2017).

Os diterpenos são os terpenóides mais comuns, com mais de 2200 compostos pertencentes a 130 tipos de esqueletos distintos. O interesse no isolamento destes compostos tem sido cada vez mais crescente devido à sua atividade biológica, função ecológica, uso como modelos para síntese e função taxonómica (Alvarenga, Gastmans, Rodrigues, Moreno, & Emerenciano, 2001; Hanson, 2009; Rijo, 2010, p.11). Os diterpenos são metabolitos secundários que ocorrem naturalmente na natureza, sendo o segundo maior grupo de terpenos resultante do metabolismo de plantas. Estes compostos são isolados maioritariamente de ductos de resina, tricomas glandulares ou células oleosas, onde estão

armazenados nas folhas. Estes diterpenos são principalmente encontrados nas plantas Angiospérmicas, dentro das quais destacando-se as pertencentes à família *Lamiaceae*, como as espécies de *Plectranthus*. Os diterpenos têm uma elevada relevância no crescimento e desenvolvimento da planta, assim como desempenham também um importante papel na resistência ao stress ambiental. A sua estrutura típica de 20 átomos de carbono apresenta 4 grupos metilo ramificados, sendo que na sua maioria são compostos cíclicos. O elevado número de ações farmacológicas descritas associadas a estes compostos, são a anti-inflamatória, anti-hipertensora, antioxidante, antibacteriana, antidiabética, antifúngica e anticancerígena, entre muitas outras. Estas atividades variadas provêm da diversidade de ciclização do esqueleto, aliada a uma vasta quantidade de grupos funcionais contendo oxigénio, como o hidroxilo ou carbonilo (Garcia et al., 2018; Pereira et al., 2015; Rijo, Faustino, & Simões, 2013a; Waldia et al., 2011).

Observa-se frequentemente a ocorrência de esqueletos específicos de diterpenos, que têm sido utilizados juntamente com a presença de outras classes de metabolitos secundários em estudos, como marcadores quimiotaxonómicos. As espécies de *Plectranthus* foram caracterizadas pela acumulação de abietanos e seus derivados, ciclopropilabietanos e seus derivados, e esqueletos de cauranos, labdanos, clerodanos e halimanos. O principal tipo de estruturas diterpénicas encontradas foram com esqueleto de caurano, labdano e abietano, e dentro destes últimos existe uma classe bem representada que são as roileanonas. Os diterpenos do tipo abietano são conhecidos por serem os principais responsáveis pelas atividades antibacteriana, antifúngica, antitumoral e antioxidante, presentes nas espécies de *Plectranthus* (Hussein, 2018; Pasoski, 2009, p.22-25; Rice et al., 2011; Rijo, 2010, p.12; Rijo et al., 2012).

Os diterpenos diversificam-se principalmente através de vias derivadas de labdano, bifurcando-se em um estágio pimarano que origina os esqueletos de caurano e de abietano (**Figura 2**) (Rijo, 2010, p.12).

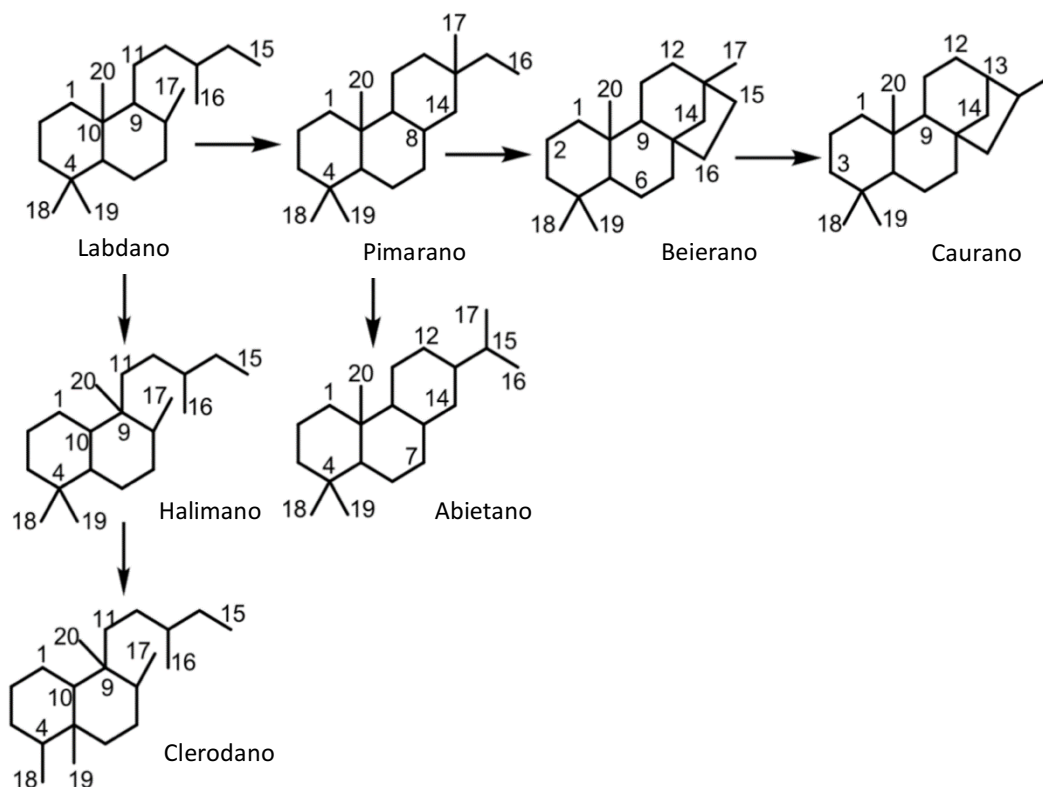


Figura 2- Representação da via metabólica de formação dos tipos de diterpenos mais comuns (Rijo, 2010, p.12).

Dentro da família *Lamiaceae*, o esqueleto de beierano foi encontrado exclusivamente no género *Sideritis*. A ocorrência de cauranos foi relatada para 8 géneros dentro da família *Lamiaceae*, incluindo *Plectranthus*. Os esqueletos de labdano foram encontrados em 20 géneros de *Lamiaceae*, e por fim, a presença de compostos com esqueleto de clerodano foi também relatada em 13 géneros de *Lamiaceae*. Os triterpenos, possuindo esqueletos na sua maioria do tipo ursano e oleanano e alguns de lupano, também ocorrem no género *Plectranthus*, mas, no entanto, as suas estruturas não são tão interessantes e diversificadas quanto as dos diterpenos de esqueleto de abietano (Alvarenga et al., 2001; Rijo, 2010, p.12-15; Topcu & Ulubelen, 2007).

Os abietanos encontrados no género *Plectranthus* não possuem os carbonos 1 e 20 oxidados. Os derivados com esqueleto 17 (15 → 16) *abeoabietano* (**a**) também foram encontrados no género *Plectranthus*, e estes diterpenos preservaram as posições 1, 2, 15, 18 e 20, assim como o esqueleto 17 (15 → 16) *abeotriptolidano* (**b**), que também foi encontrado no género *Plectranthus*, e que manteve as posições 1, 15, 19 e 20 como no esqueleto original (**Figura 3**). Os esqueletos 13 (16) - ciclopropilabietano (**c**) e 13 (16) - ciclopropilriptolidano (**d**), são derivados do abietano e estão presentes no género *Plectranthus* (**Figura 3**). Em ambos, verifica-se a presença de um átomo de oxigénio ligado nas posições C-6 e C-12, a

formação de um grupo carbonilo em C-11 e C-14, e uma ligação dupla entre C-8 e C-9. O esqueleto original foi mantido nas posições 1, 2, 5 e 20. Os ciclopropilabietanos de *Plectranthus* foram adicionalmente conservados a 15, 16, 17 e 18, e apresentaram um oxigénio ligado a C-7 (Alvarenga et al., 2001; Rijo, 2010, p.12-15).

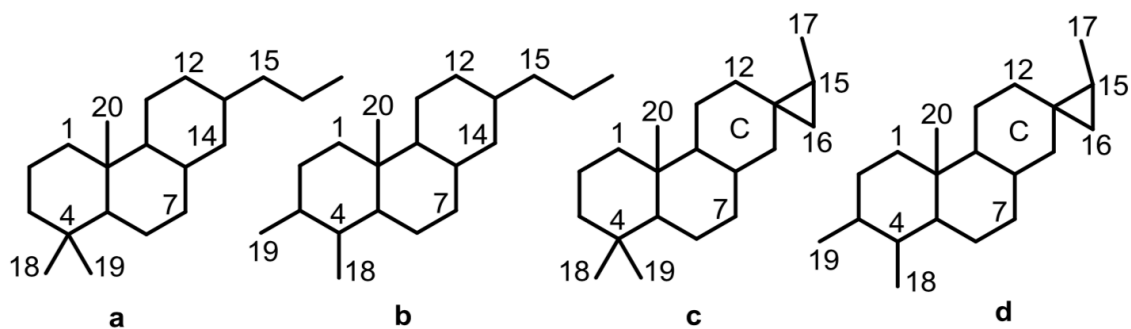


Figura 3- Esqueletos dos derivados de abietano encontrados no género *Plectranthus*. 17(15 → 16) abeoabietano (**a**), 17(15 → 16) abeotriptolidano (**b**), 13(16)-ciclopropilabietano (**c**) e 13(16)-ciclopropiltriptolidano (**d**) (Rijo, 2010, p.14).

3. O género *Plectranthus* L' Hérít

O género *Plectranthus* foi descrito pela primeira vez pelo botânico francês L' Hérítier, em 1788, que foi o responsável pela atribuição do nome *Plectranthus* a este novo género de plantas, baseando-se na observação das únicas espécies que tinha disponíveis. Estas espécies eram a *Plectranthus fruticosus* e *Plectranthus punctatus* que apresentavam ambas um esporão, que é um prolongamento em forma cónica, situado na base da corola ou do cálice, e como tal, *plectron* significa esporão e *anthos*, flor. Por falta de conhecimento deste novo género, L' Hérítier não sabia que a maioria das espécies de *Plectranthus* não possui um esporão na sua corola ou cálice, mas, uma vez oficialmente descrito e publicado, o nome *Plectranthus* acabou por ser aceite e passou a ser usado para as designar (Waldia et al., 2011).

Algumas das espécies de *Plectranthus* foram também trazidas para o Novo Mundo após os Descobrimentos Portugueses, em meados do século XVI (Rijo et al., 2012, 2013a). Estas plantas são da família *Lamiaceae*, e da subfamília *Nepetoideae*, contendo cerca de 350 espécies e 200 géneros, e são também encontradas na Ásia, Austrália, Índia, África subsariana, Indonésia e algumas ilhas do Pacífico (Pasoski, 2009, p.17).

As espécies de *Plectranthus* podem ser ervas, subarbustos (plantas rasteiras) ou arbustos e são plantas suculentas que apresentam folhas distribuídas no caule de forma oposta (**Figura 4**). A parte da planta semelhante a um prolongamento do caule e que contém as flores, chamada de inflorescência, pode ser terminal, sendo que as flores estão dispostas no final dos ramos, axilar onde as flores estão dispostas na parte superior das folhas, ou então cimosa, onde em cada eixo dessa inflorescência é possível encontrar uma flor e os ramos laterais crescem mais que o eixo central, que por sua vez termina numa flor (**Figura 5**) (Pasoski, 2009, p.17-18).



Figura 4- Folhas típicas das espécies de *Plectranthus* (Pasoski, 2009, p.18).



Figura 5- Flores típicas das espécies de *Plectranthus* (Pasoski, 2009, p.18).

As plantas do género *Plectranthus* apresentam uma importância significativa entre os povos nativos da África do Sul, principalmente devido ao seu uso extensivo na horticultura, uma vez que apresentam um crescimento rápido, por serem resistentes a uma grande maioria das pragas e doenças típicas de plantas, e por conseguirem sobreviver em condições de seca. Também têm um uso ornamental porque algumas produzem flores bastante atrativas, sendo por isso polinizadas por várias espécies de insetos, que por elas são atraídos. Estas plantas têm ainda uma maior importância na medicina tradicional, onde são utilizadas no tratamento de infeções, patologias digestivas, de pele, urinárias, genitais, respiratórias, febre, variados tipos de dor, como por exemplo, a musculoesquelética, alergias e cancro (Andrade et al., 2018; Hussein, 2018; Lukhoba, Simmonds, & Paton, 2006; Pasoski, 2009, p.20-21; Rice et al., 2011; Rijo et al., 2013a; Waldia et al., 2011). Apesar destes usos já conhecidos por várias culturas, algumas espécies de *Plectranthus* ainda não foram descritas, muito devido à falta de informação atual (Pasoski, 2009, p.20-21).

Vários estudos sobre espécies do género *Plectranthus* descrevem várias atividades biológicas, fornecendo evidências científicas para o seu uso em preparações tradicionais de ervas. Muitas atividades biológicas foram atribuídas às plantas deste género e a atividade antimicrobiana é muito citada (Maistry, 2003, p.4). Também existem outros exemplos como a atividade acaricida (Rasikari, 2007, p.3), propriedades herpéticas inibitórias e antioxidantes, ou efeito gastroprotetor (Gaspar-Marques, Simões, Valdeira, & Rodríguez, 2008).

Assim sendo, a atividade biológica dos compostos e o facto destas plantas já serem amplamente utilizadas em cuidados primários nos países em desenvolvimento, tornam as espécies de *Plectranthus* num bom ponto de partida para a pesquisa e descoberta de potenciais compostos bioativos de valor terapêutico, e como fontes de compostos protótipo no desenvolvimento de fármacos (Rijo et al., 2012).

No presente trabalho, pretendeu-se estudar a atividade biológica de cinco espécies do género *Plectranthus*, sendo estas, *Plectranthus hadiensis* (*P. hadiensis*), *Plectranthus inflexus* (*P. inflexus*), *Plectranthus lippio* (*P. lippio*), *Plectranthus welshii* (*P. welshii*) e *Plectranthus mzubulensis* (*P. mzubulensis*). De acordo com o nosso conhecimento, apenas estão descritas informações na literatura acerca de *P. inflexus* e *P. hadiensis*, sendo que as restantes três espécies não foram estudadas anteriormente.

3.1 Classificação Taxonómica

Algumas espécies de *Plectranthus* são difíceis de identificar, devido à falta de critérios morfológicos claros para discriminar não apenas entre as espécies dentro do mesmo género, mas também entre os géneros semelhantes, o que resultou em numerosos problemas taxonómicos na nomeação de espécies, e como tal, algumas espécies foram frequentemente colocadas em vários géneros semelhantes, como por exemplo, o *Coleus* e *Isodon* (Lukhoba et al., 2006; Rijo, 2010, p.18-19). Filogeneticamente, as espécies de *Plectranthus* são divididas em dois grandes grupos que provêm do mesmo ancestral comum, designados em inglês por *clade*, que são o *clade* I, correspondente ao género *Coleus* formalmente reconhecido e que era mais rico em número e diversidade de usos. Nomeadamente são muito usados como medicamentos e para tratar uma variedade de doenças, particularmente problemas digestivos, cutâneos, infecciosos e respiratórios. O *clade* I (género *Coleus*) é também o género mais estudado quer taxonomicamente, quer economicamente, relativamente aos membros do outro grupo, o *clade* II, que contempla as restantes espécies do género *Plectranthus*. As espécies com um maior uso medicinal, são também as que apresentam um maior número de sinónimos, e como tal, é compreensível que a alta incidência de sinónimos pode levar a inúmeros problemas na descoberta do perfil etnobotânico de uma espécie (Lukhoba et al., 2006; Rijo, 2010, p.18-19).

Atualmente, existem algumas diferenças nas divisões e classificações taxonómicas do género *Plectranthus*. Estas divisões foram efetuadas de acordo com as semelhanças morfológicas e físicas apresentadas, e também após análise a algumas regiões do genoma destas plantas. Os géneros *Plectranthus* e *Coleus* pertencem à subtribo Plectranthinae, que é a maior de sete subtribos pertencentes à tribo Ocimeae (Paton, Mwanyambo, & Culham, 2018). O género *Coleus* pode ser dividido ainda em dois *clades*, A e B, sendo o *clade* B o que apresenta o maior número de espécies com uso medicinal, dentro do qual se inserem por exemplo, *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus caninus*, *Plectranthus barbatus* e *Plectranthus hadiensis*. Dentro do género *Plectranthus*, existem seis *clades*, sendo eles o *clade* *Alvesia*, o *clade* *Aeollanthus*, o *clade* I que compreende os géneros *Tetradenia* e *Thorncroftia*, o *clade* II compreendendo o género *Plectranthus* s.s., o *clade* III o género *Capitanopsis* e o *clade* IV com o género *Equilabium* (Paton et al., 2018).

Tal como referido anteriormente, apesar da dificuldade na identificação de espécies, em um novo estudo são apresentados alguns dos caracteres morfológicos que auxiliam na distinção entre diferentes géneros e *clades* (Paton et al., 2018).

De seguida, na **Figura 6**, apresenta-se um esquema que expõe de uma forma resumida, como está feita atualmente a classificação taxonómica do género *Plectranthus*, contemplando a tribo, subtribo, géneros e respetivos *clades*.

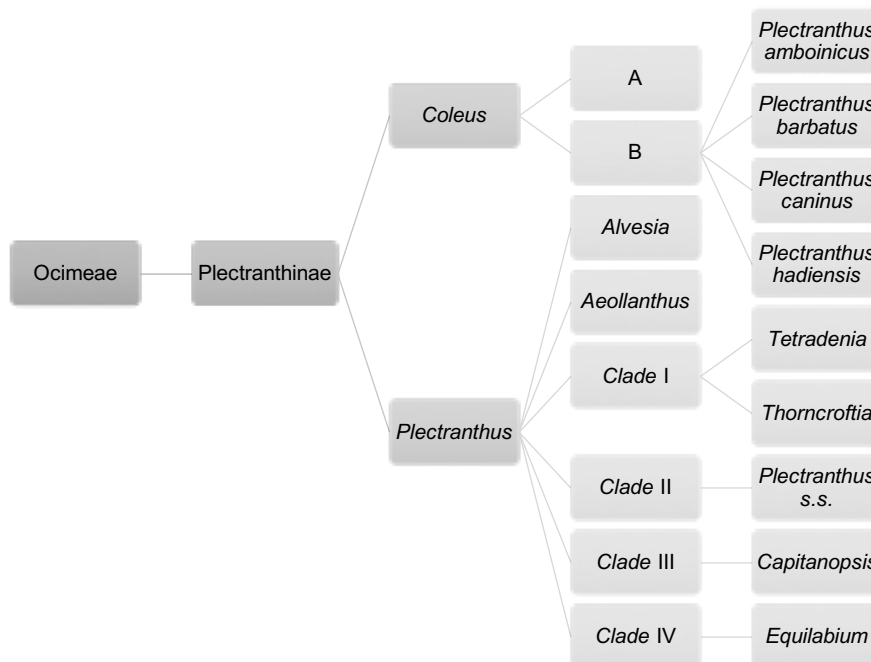


Figura 6- Representação da classificação taxonómica atual do género *Plectranthus*.

Na **Tabela 1**, é possível encontrar informação resumida sobre a classificação taxonómica do género *Plectranthus*, assim como a sua distribuição geográfica, habitat e características morfológicas que permitem fazer a sua distinção.

Tabela 1- Classificação taxonómica atual do género *Plectranthus*, a sua distribuição geográfica, habitat e características morfológicas de diagnóstico.

Género	Clade	Distribuição geográfica	Habitat	Características morfológicas de diagnóstico
<i>Coleus</i>	A	Maioritariamente endémicas de África, mas também podem ser encontradas em Madagáscar e Ásia	Florestas sazonalmente secas, margens de florestas e montanhas	Cálice em forma de funil, corola labiada com lábio superior muito mais curto que o inferior, e pedúnculo em frente ao lábio superior da corola
	B			
<i>Plectranthus</i>	<i>Alvesia</i>	Apenas endémicas de África	Apenas em florestas secas	Cálice possui três lóbulos
	<i>Aeollanthus</i>		Florestas sazonalmente secas, margens de florestas e montanhas	Cálice em forma de tubo achatado
	I	Endémica de África e Madagáscar	Florestas sazonalmente secas, margens de florestas e montanhas	<i>Tetradenia</i> - Corola em forma de funil, e pares anteriores e posteriores de estames separados por uma abertura no ponto de inserção da corola <i>Thorncroftia</i> - Corola em forma de cilindro curvado para baixo, e os lóbulos laterais da corola flexionam-se em direção ao lábio inferior
	II	Endémica de África e Madagáscar, mas possui uma espécie endémica da Ásia	Principalmente em margens de florestas ou desfiladeiros	Cálice em forma de funil e corola com os lábios superiores e inferiores iguais em comprimento; lóbulos laterais e inferiores do cálice são adjacentes
	III	Apenas endémica de Madagáscar	Apenas em florestas secas	Cálice de várias formas, desde membranoso até cilíndrico, e lóbulos laterais e superiores curtos
	IV	Maioritariamente endémica de África, mas com uma espécie endémica de Madagáscar e duas da Ásia	Florestas sazonalmente secas, margens de florestas e montanhas	Cálice em forma de funil e lábios da corola superior e inferior iguais em comprimento

3.2 *Plectranthus inflexus*

P. inflexus, sinónimo de *Isodon inflexus*, (fonte: <http://www.naturalmedicinalherbs.net/herbs/i/isodon-inflexus.php>, consultado em 13/06/2018) é uma planta perene com cerca de 60 cm de altura, possuindo folhas de forma ovalada com os bordos em serra (**Figura 7**) e apresenta flores com cores que vão de um roxo até ao avermelhado (**Figura 8**) (fonte: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=2&taxon_id=210000784 , consultado em 13/06/2018).



Figura 7- Folhas de *P. inflexus* (fonte: <http://flowers.la.coocan.jp/Lamiaceae/Isodon%20inflexus.htm>, consultado em 13/06/2018).



Figura 8- Flores de *P. inflexus* (fonte: <http://flowers.la.coocan.jp/Lamiaceae/Isodon%20inflexus.htm>, consultado em 13/06/2018).

3.2.1 Diterpenóides isolados de *P. inflexus*

Num estudo realizado por (Xie, Li, Zhao, Liu, & Row, 2012), para pesquisa de potenciais agentes anti-inflamatórios, foram isolados desta planta quatro diterpenos do tipo abietano, sendo estes, inflexanina C, inflexanina D, inflexusida A e inflexusida B. O objetivo deste estudo, foi determinar as estruturas e reportar os efeitos inibitórios destes mesmos diterpenos sobre a produção de óxido nítrico (NO), que é um radical livre essencial da imunidade inata do hospedeiro. Também foi estudada a resposta inflamatória a uma variedade de agentes patogénicos, em linhagens celulares de macrófagos de murganho RAW264.7, ativados por lipopolissacarídeo (LPS) (Xie et al., 2012).

Na **Figura 9**, encontram-se representadas as estruturas químicas dos diterpenos abietanos isolados de *P. inflexus*.

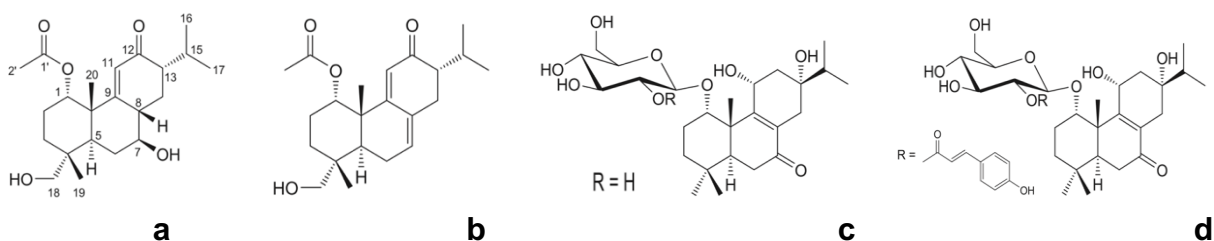


Figura 9- Estruturas químicas dos diterpenos abietanos isolados de *P. inflexus*. Inflexanina C (a), Inflexanina D (b), Inflexusida A (c) e Inflexusida B (d) (Xie et al., 2012).

Anteriormente, já tinham sido isolados desta mesma planta mais dois compostos, a inflexanina B e o inflexinol, que são diterpenos do tipo *ent*-caurano, cujas estruturas químicas se encontram representadas na **Figura 10** (Hong et al., 2007).

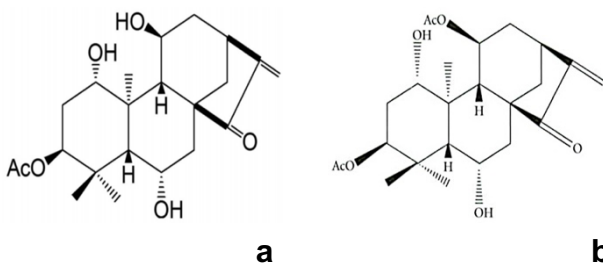


Figura 10- Estruturas químicas dos diterpenos *ent*-cauranos isolados de *P. inflexus*. Inflexanina B (a) e Inflexinol (b) (Lee et al., 2007; Lim et al., 2013).

3.2.2 Atividade biológica dos diterpenos abietanos de *P. inflexus*

Num estudo realizado por (Xie et al., 2012), foi possível concluir que os quatro diterpenos abietanos mostraram forte atividade inibitória contra a produção de NO, o que sugere que possam ser potenciais alvos para o tratamento de doenças inflamatórias (Andrade et al., 2018; Xie et al., 2012), especialmente o composto inflexanina D, que exibiu a atividade inibitória mais potente. Também se pode afirmar que nenhum dos compostos testados tinha qualquer potencial citotoxicidade em relação às células RAW264.7, o que sugeriu que as atividades inibitórias da produção de NO nas células RAW264.7 ativadas por LPS, não foram induzidas pela citotoxicidade dos compostos testados (Xie et al., 2012).

Também num estudo anteriormente realizado por (Ko et al., 2010), percebeu-se que as inflexaninas podem ser desenvolvidas como agentes terapêuticos potentes no tratamento de doenças neuroinflamatórias. Como tal, foram investigados os efeitos inibitórios das inflexaninas na produção de mediadores pró-inflamatórios na micróglia, estimulados por LPS (Ko et al., 2010; Lim et al., 2013).

A micróglia são as células imunitárias de vigilância do sistema nervoso central (SNC), que normalmente se encontram inativadas, mas cuja função é atuarem como sensores para uma variedade de estímulos que ameaçam a homeostasia fisiológica (Ko et al., 2010; Liu & Hong, 2003; Xie et al., 2012). Por isso, quando ativadas, desempenham um papel ativo nos processos inflamatórios e degenerativos do cérebro e exercem efeitos citotóxicos, ao libertarem vários mediadores inflamatórios (Ko et al., 2010; Lim et al., 2013; McGeer et al., 1993). Embora estes sejam necessários para a função neuronal normal, a resposta microglial deve ser altamente regulada para evitar a sua ativação excessiva e consequências neurotóxicas graves associadas a várias doenças neurodegenerativas (Ko et al., 2010; Lim et al., 2013; Liu & Hong, 2003).

O LPS, cujos mecanismos de sinalização intracelular foram estudados na micróglia, ativa proteínas, tirosinas quinases e fator nuclear kappa B (NF- κ B), que estão implicados na libertação de fatores citotóxicos relacionados com o sistema imunológico, tais como NO e citocinas pró-inflamatórias (Chen, Wang, Chen, & Lin, 1998; Ko et al., 2010; Lim et al., 2013).

Concluiu-se em estudos realizados por (Ko et al., 2010; Lim et al., 2013), que existe uma redução leve da viabilidade celular em células da micróglia tratadas com inflexaninas, mas a sua capacidade de diminuir a produção de mediadores pró-inflamatórios nestas células, não advém do facto de serem citotóxicas (Ko et al., 2010).

As inflexaninas inibiram significativamente a libertação de NO, reduziram a expressão de citocinas pró-inflamatórias induzidas por LPS de uma maneira dependente da concentração, e foram capazes de suprimir a neuroinflamação via inibição da ativação do NF-

kB (Ko et al., 2010; Madrid, Mayo, Reuther, & Baldwin, 2001). Estes resultados sugerem que as inflexaninas têm a capacidade de interromper algumas das principais vias de transdução de sinal induzidas por LPS em células da micróglia, impedindo subsequentemente a produção de mediadores pró-inflamatórios (Ko et al., 2010).

3.2.3 Atividade biológica dos diterpenos *ent*-cauranos de *P. inflexus*

Em vários estudos, percebeu-se que a inflexanina B e o inflexinol têm a capacidade de inibir a ativação de NF-kB induzida por LPS e a produção de NO em macrófagos RAW264.7 (Hong et al., 2007; Lee et al., 2007).

Estudos realizados anteriormente, referem que alguns diterpenóides com esqueleto *ent*-caurano inibem a ativação de NF-kB, que por sua vez desempenha um papel fundamental na regulação dos genes da óxido nítrico sintase (iNOS), que é a enzima que catalisa a produção de NO em macrófagos. Várias doenças inflamatórias e auto-imunes estão associadas ao excesso de produção de NO. Devido ao envolvimento aparente do NF-kB, quando desregulado, em uma variedade de doenças humanas, os seus inibidores têm considerável interesse farmacológico e terapêutico em áreas focadas na inflamação e cancro (Hong et al., 2007; Lee et al., 2007).

Concluiu-se que a falta de um grupo carbonilo no carbono 15, faz com que haja a perda de atividade inibitória de NF-kB e de NO. Existe também um grupo funcional α -metilenociclopentanona, que está presente nos diterpenóides *ent*-cauranos ativos, e que se pensa que seja o responsável por estes efeitos inibitórios. Como tal, estes resultados suportam a base farmacológica desta planta sendo usada como um medicamento tradicional para o tratamento da inflamação e cancro (Hong et al., 2007).

Para além disto, (Lee et al., 2007) afirma que o inflexinol tem a capacidade de suprimir a expressão da ciclooxigenase (COX)-2 através da inibição da ativação de NF-kB, uma vez que a COX-2 é uma enzima produzida como resposta a um processo inflamatório, cuja expressão pode ser regulada pela ativação do NF-kB (Lee et al., 2007).

Novamente foi possível concluir que, tal como já referido anteriormente para os outros diterpenos, tanto a inflexanina B como o inflexinol apresentam um efeito inibitório de mediadores inflamatórios que não está relacionado com o efeito citotóxico, uma vez que não se observam alterações na viabilidade celular dos macrófagos RAW264.7. Para além disto, o inflexinol possui ainda efeitos superiores a dois anti-inflamatórios não esteróides (AINES) (indometacina e lornoxicam) na inibição da produção de NO nos macrófagos RAW264.7 estimulados por LPS, sendo que esta inibição poderá estar relacionada com a inibição da

iNOS em macrófagos RAW 264.7, por este mesmo composto (Hong et al., 2007; Lee et al., 2007).

De seguida, na **Tabela 2**, apresenta-se a informação resumida acerca de *P. inflexus*, os respetivos compostos bioativos encontrados nesta planta, qual a sua atividade e qual o mecanismo de ação, se conhecido, que se pensa que seja o responsável por essa mesma atividade biológica.

Tabela 2- Informação resumida sobre *P. inflexus*, quais os seus compostos com atividade biológica, o tipo de atividade biológica e o mecanismo de ação que se pensa ser o responsável por essa mesma atividade.

Espécie	Compostos com atividade biológica	Tipo de atividade biológica	Mecanismo de ação
<i>Plectranthus inflexus</i>	Inflexanina C (Figura 9 a)	Anti-inflamatória	
	Inflexanina D (Figura 9 b)		
	Inflexusida A (Figura 9 c)		
	Inflexusida B (Figura 9 d)		
	Inflexanina B (Figura 10 a)		Grupo carbonilo no carbono 15 e presença de um grupo funcional α -metilenociclopentanona, levando à atividade inibitória de NF-kB e de NO
	Inflexinol (Figura 10 b)		

3.3 *Plectranthus hadiensis*

Plectranthus ramosior Benth. Van Jaarsv. (*P. ramosior*), cujo nome oficial aceite é *P. hadiensis*, (fonte: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-347956>, consultado em 08/06/2018), e tendo esta última inúmeros sinónimos como *Plectranthus zeylanicus* Benth., *Plectranthus cyaneus* Gurke ex Engler e *Plectranthus zatarhendi* (Benth.) E.A. Bruce (Lukhoba et al., 2006), é uma planta perene, semi-suculenta, com caules até 15 cm de altura, possuindo folhas redondas e dentadas (**Figura 11**) e apresentando flores brancas ou roxas em longas hastes (**Figura 12**) (fonte: <https://wildflowernursery.co.za/indigenous-plant-database/plectranthus-ramosior/>, consultado em 08/06/2018).



Figura 11- Folhas de *P. hadiensis* (fonte: <https://www.inaturalist.org/observations/11301258>, consultado em 08/06/2018).



Figura 12- Flores de *P. hadiensis* (fonte: <https://www.inaturalist.org/observations/11301258>, consultado em 08/06/2018).

Esta planta é conhecida por ser uma das 10 espécies de *Plectranthus* mais utilizadas na medicina tradicional (Lukhoba et al., 2006), possivelmente devido ao facto de após a sua avaliação fitoquímica terem sido encontrados polifenóis, alcalóides, taninos, saponinas, glicosídeos cardíacos e terpenóides (Menon & Sasikumar, 2011). Tradicionalmente é usada na África do Sul sob a forma de enema para o tratamento da tosse (Rice et al., 2011), e no

Sul da Índia e Sri Lanka para tratar patologias do sistema digestivo, como a diarreia (Mehrotra, Vishwakarma, & Thakur, 1989). Também é utilizada no tratamento de patologias cutâneas e estados inflamatórios (Lukhoba et al., 2006), como por exemplo, através da inibição da 5-lipooxigenase (5-LOX), que é uma enzima-chave em patologias inflamatórias como a asma ou a aterosclerose (Napagoda et al., 2014). É usada também no tratamento de doenças hepáticas crônicas, oculares e dentárias (Napagoda et al., 2014), como antifúngico para tratamento de infecções por *Aspergillus* (Mashfiya & Haroon, 2016), e o seu óleo essencial é usado como antimicrobiano (Soyza, Wijayarathne, Napagoda, & Witharana, 2016; Sripathi & Ravi, 2017), antioxidante (Attanayake & Jayatilaka, 2016) e como antídoto para picadas de aranha (Napagoda et al., 2014).

Outra das suas utilizações medicinais é como anti-malárico, sendo que alguns dos seus diterpenos de esqueleto abietano são mais ativos do que a quinina, que é um fármaco utilizado para o tratamento da malária. Quando combinados com a quinina, têm um efeito sinérgico, e também exibem uma significativa atividade inibitória da formação de β -hematina. Estes efeitos terapêuticos podem ser devido à natureza lipofílica dos diterpenos abietanos, que permite o seu fácil transporte através das membranas eritrocitárias e parasíticas, para se acumularem no vacúolo alimentar do parasita. O efeito inibitório destes compostos parece estar relacionado com a sua capacidade de prevenir a formação de β -hematina. Este é um efeito importante, porque o parasita da malária degrada a hemoglobina, e o grupo heme libertado que é tóxico para o parasita, é normalmente convertido no pigmento de malária inerte, a β -hematina (Zyl, Khan, Edwards, & Drewes, 2008).

Por fim, também se descobriu que alguns dos seus terpenóides, principalmente mono- e sesquiterpenos, têm a capacidade de induzir a apoptose de células humanas de cancro do cólon através da via dependente da mitocôndria, e por isso confirma-se, tal como já relatado em inúmeros estudos, que esta planta possui atividade citotóxica e a aplicação dos terpenóides no tratamento do cancro (Menon & Gopalakrishnan, 2015).

Para além dos usos descritos anteriormente, também possui usos não medicinais, como por exemplo, utilização como adorno de jardins feitos de pedra (Rice et al., 2011). Na Tanzânia é utilizada como alimento para animais e na apicultura (Lukhoba et al., 2006), e as suas infusões eram usadas como um feitiço para afastar os espíritos malignos (Rice et al., 2011). Apresentam também um efeito repelente e inseticida, uma vez que o seu óleo essencial é usado para prevenção de pragas em algumas leguminosas (Balachandra, Pathirathna, & Paranagama, 2012).

3.3.1 Diterpenóides isolados de *P. hadiensis*

Nesta planta, é conhecida a existência de compostos com atividade biológica, sendo estes, diterpenos abietanos pertencentes à classe das roileanonas (**Figura 13**). As roileanonas devem o seu nome a um pigmento amarelo presente nas raízes da planta *Inula royleana*, constituído por uma mistura de acetoxiroileanona, de-hidroroileanona e roileanona. Uma característica comum a este tipo de diterpenos, é o facto de apresentarem um sistema cromofórico de hidroxi-*para*-quinona no anel C. Uma roileanona consiste numa estrutura tricíclica contendo um esqueleto de carbono de um abietano com uma estrutura de uma hidroxi-*para*-quinona, sendo a roileanona mais simples, o cromóforo 12-hidroxi-11,14-*para*-benzoquinona no anel C do esqueleto de um abietano. Para além do anel C de quinona, podem também apresentar anéis A e B oxidados que possuem características aromáticas (Ladeiras et al., 2016; Rijo, Duarte, Francisco, Semedo-Lemsaddek, & Simões, 2013b).

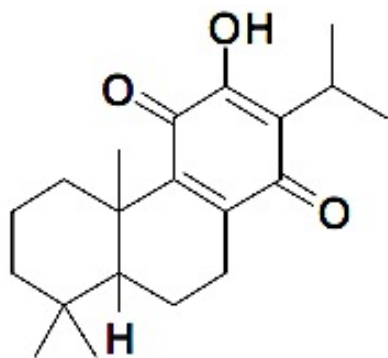


Figura 13- Estrutura química de uma roileanona (Ladeiras et al., 2016).

As roileanonas isoladas de *P. hadiensis* são 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, o seu estereoisómero 7 β -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona e 6 β ,7 β -dihidroxiroileanona (Ladeiras et al., 2016; Lukhoba et al., 2006). Anteriormente, também foram isolados desta mesma planta, os diterpenos abietanos 7 α -formiloxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona e 7 α -acetoxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona (Onguéné et al., 2013).

3.3.1.1 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona

7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (**Figura 14**), é um derivado obtido principalmente através de reações químicas de esterificação e acetilação da roileanona (Ladeiras et al., 2016).

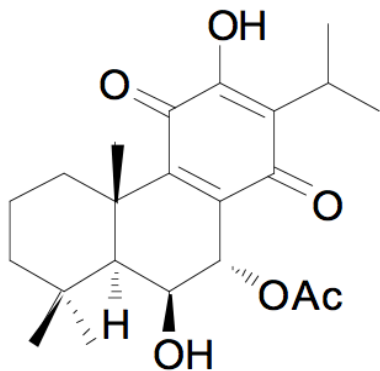


Figura 14- Estrutura química de 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (Ladeiras et al., 2016).

Já se realizaram estudos *in vitro* em linhas de células tumorais humanas, da mama, pulmões, rins, pele e SNC, que comprovaram que este mesmo composto apresenta uma elevada atividade antitumoral, dose-dependente e após exposição contínua, quando comparado com outros diterpenos abietanos. No entanto, esta atividade antitumoral deve-se ao facto de este abietano ter a capacidade de parar o crescimento das células (antiproliferativo) e não devido ao facto de ter a capacidade de causar a sua morte (citotóxico). As principais causas da sua elevada capacidade antiproliferativa, poderão residir no facto de este composto ser uma roilenona monomérica, ou seja, possui um tamanho menor, e da acetilação aumentar a lipofilicidade, facilitando desta forma a sua penetração no interior da membrana celular (Garcia et al., 2018; Ladeiras et al., 2016; Marques et al., 2002; Yulianto, Andarwulan, Giriwono, & Pamungkas, 2016).

Esta roileanona também é responsável por outro tipo de atividade biológica, como a imunomoduladora. Através da avaliação do seu efeito na proliferação de linfócitos humanos, induzidos pelo estimulador de proliferação celular fitohemaglutinina, foi possível perceber que este composto possui um elevado efeito supressor dose-dependente, devido à natureza dos substituintes presentes no carbono 7 α , como o grupo acetil, que têm assim um papel decisivo no seu efeito antiproliferativo. Devido ao facto de apresentar uma capacidade antiproliferativa significativa nos linfócitos humanos, também se avaliou como esta roileanona afeta a proliferação das duas populações de linfócitos, as células B e T, usando como modelo

linfócitos de murganho, e usando como mitogénio das células B o LPS e como mitogénio das células T a Concanavalina A (Con A) (Cerqueira et al., 2004; Ladeiras et al., 2016).

Conclui-se então que 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona tem a capacidade de inibir fortemente a proliferação de linfócitos induzida por LPS e Con A, mas no entanto, existe uma inibição mais forte da resposta proliferativa de linfócitos induzida por Con A do que por LPS, o que leva a afirmar que este composto é um potente inibidor da proliferação de linfócitos B e T, sendo as células T mais sensíveis ao efeito supressor e portanto, existindo uma inibição preferencial da proliferação deste tipo de células (Cerqueira et al., 2004; Ladeiras et al., 2016).

O efeito antiproliferativo deste terpenóide poderá ser explicado devido à inibição do fator de transcrição NF-kB, que está relacionada com a supressão da proliferação de linfócitos, sendo que os diterpenos têm a capacidade de inibir fortemente a ativação de NF-kB. Também poderá ser devido à proteína tirosina quinase, que quando fosforilada gera sinais que levam à proliferação de células T, e que é indispensável para que haja secreção de interleucina 2 (IL-2), cuja presença por sua vez também é essencial para a ativação de células T, e alguns diterpenos abietanos têm a capacidade de inibir esta interleucina, e portanto a inibição da proliferação de células T pode estar relacionada com a inibição desta interleucina pelo 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (Cerqueira et al., 2004; Ladeiras et al., 2016).

Também se estudou a atividade antimicrobiana desta roileanona contra *Staphylococcus aureus* resistentes à metacilina (SARM) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (ERV), concluindo-se que é um composto muito ativo contra SARM e apresenta uma atividade moderada contra ERV. O responsável por esta atividade poderá ser a presença de uma fração 12-hidroxi-*para*-benzoquinona no anel C, simultaneamente com um anel B oxidado nos carbonos 6 e 7, que é característico das roileanonas, e se existir um padrão de substituição 6 β -hidroxil e 7 α -acetoxil, como se verifica neste abietano, a atividade ainda é maior. Por fim, também novamente a presença de um grupo acetoxi no carbono 7, aumenta a atividade antimicrobiana devido ao facto de conferir lipofilicidade à molécula (Gaspar-Marques, Rijo, Simões, Duarte, & Rodriguez, 2006; Ladeiras et al., 2016; Rijo et al., 2013b).

Por fim, também se verificou em estudos anteriores que esta roileanona é ativa contra as estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv e Tuberculose multirresistente (TBMR). Possui maior atividade do que os fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose, a rifampicina e a isoniazida, mas, no entanto, alguns dos derivados preparados a partir de 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, como por exemplo, alguns monoésteres aromáticos, como o 12-clorobenzil e 12-metoxibenzil, são ainda mais

ativos, pois estes possuem modificações que lhes conferiram características extra-lipofílicas, o que levou ao aumento de interações hidrofóbicas com os alvos dos microrganismos em estudo. Isto poderá ser devido ao grupo metoxi do éster 12-metoxibenzil fornecer um aceitador de ligação de hidrogénio extra-benéfico, e o átomo de cloro extra do éster 12-clorobenzil providenciar uma interação lipofílica mais eficiente com as bactérias TBMR. Como tal, o aumento das características lipofílicas do composto, providenciadas pelo esqueleto constituído pelos 3 anéis A, B e C típicos da estrutura das roileanonas, está diretamente relacionado com um aumento da atividade antimicrobiana, uma vez que o aumento da lipofilicidade permite uma melhor e maior penetração dentro da membrana celular. Também aliada às características lipofílicas, a existência de grupos funcionais hidrofílicos contendo oxigénio como os ésteres, hidroxilos e carbonilos, que têm a capacidade de estabelecer ligações de hidrogénio como átomos dadores ou recetores com os alvos microbianos, podem também ser responsáveis por determinar a bioatividade dos compostos (Andrade et al., 2018; Rijo et al., 2010, 2013b).

3.3.1.2 7 β -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona

7 β -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (**Figura 15**), é um conhecido estereoisómero de 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (Ladeiras et al., 2016).

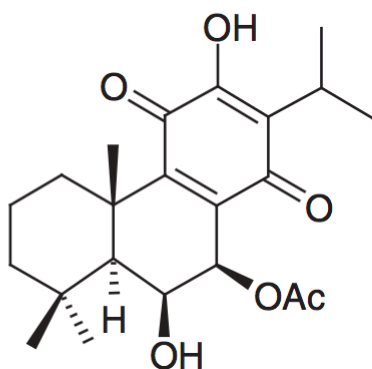


Figura 15- Estrutura química de 7 β -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (Kubínová et al., 2014).

Foi estudada a sua atividade antimicrobiana, onde se concluiu que é ativo contra as bactérias Gram-positivas *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Kubínová et al., 2014).

Também foi estudada a sua capacidade de inibir a atividade da butirilcolinesterase (BuChE) e da α -glucosidase (Kubínová et al., 2014).

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima presente nas sinapses colinérgicas, responsável pela degradação por hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em acetato e colina, que desempenha um papel essencial na transmissão do impulso nervoso, e que é sintetizado nos neurónios. O acetato e a colina podem então ser reutilizados para a formação de nova ACh, e também para que não haja uma acumulação deste mediador químico nas sinapses, o que levaria a uma hiperestimulação dos recetores nicotínicos e muscarínicos e consequentemente, à interrupção da neurotransmissão (Kubínová et al., 2014; Silva, 2015, p.3; Tardelli, 2002).

A ACh apresenta-se em défice no cérebro de idosos que sofrem de algumas formas de demência como a Doença de Alzheimer (DA), sendo que a AChE predomina no cérebro saudável, enquanto que a BuChE é responsável por regular os níveis de ACh no cérebro. Estes dois tipos de colinesterases, embora sejam evolutivamente semelhantes, diferenciam-se quanto à sua distribuição nos tecidos, as suas propriedades cinéticas, e pela especificidade para com os seus substratos. A AChE encontra-se mais abundantemente no SNC, nos músculos esqueléticos e na membrana dos eritrócitos, enquanto que a BuChE se encontra maioritariamente no plasma sanguíneo, sendo por este motivo conhecida também como colinesterase plasmática (Araújo, Santos, & Gonsalves, 2016). A AChE e BuChE apresentam semelhanças estruturais, sendo que os seus aminoácidos apresentam aproximadamente 50% de homologia, e as diferenças entre estes são responsáveis pelas diferenças de seletividade tanto dos substratos, quanto dos inibidores destas enzimas. A AChE hidrolisa preferencialmente a ACh, enquanto que a BuChE é menos seletiva, e atua hidrolisando tanto a ACh quanto a Butirilcolina (BuCh), em quantidades comparáveis (Araújo et al., 2016).

No entanto, tem-se vindo a verificar que ao longo da progressão da DA, os níveis de BuChE vão aumentando, enquanto que os de AChE permanecem iguais ou diminuem. Por esta razão, estas enzimas poderão ser alvos interessantes de estudo para a tentativa de encontrar uma terapêutica para esta doença (Kubínová et al., 2014).

Concluiu-se então que 7 β -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona é efetivamente um inibidor da BuChE, mas, no entanto, a sua atividade é cerca de duas vezes menor do que o composto de referência, a galantamina, que é um fármaco utilizado no tratamento da DA. No entanto, esta inibição pode ser devido à presença de uma ligação éster nesta roileanona, o que poderá contribuir para esta atividade (Kubínová et al., 2014).

A α -glucosidase é uma enzima intestinal que tem a capacidade de clivar os hidratos de carbono em monossacáridos com tamanhos menores, e desta forma conseguem ser absorvidos pelo organismo, como é o caso da glucose. Os inibidores da α -glucosidase como a acarbose, têm sido utilizados no tratamento da diabetes *mellitus* tipo 2, uma vez que se ligam a esta enzima causando a sua inibição, levando a que haja assim uma diminuição da

degradação de hidratos de carbono e consequentemente, reduzindo a glucose pós-prandial e os picos de insulina (Andrade-Cetto, Becerra-Jiménez, & Cárdenas-Vázquez, 2008; Kubínová et al., 2014).

Concluiu-se então que 7 β -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona possui uma atividade inibitória maior do que a acarbose, que foi usada como composto de referência, uma vez que é um fármaco antidiabético, e como tal, esta roileanona poderá ser um composto promissor para o tratamento da diabetes *mellitus* tipo 2 (Kubínová et al., 2014).

3.3.1.3 6 β ,7 β -dihidroxiroileanona

6 β ,7 β -dihidroxiroileanona (**Figura 16**) é outra das roileanonas isoladas de *Plectranthus hadiensis* (Ladeiras et al., 2016).

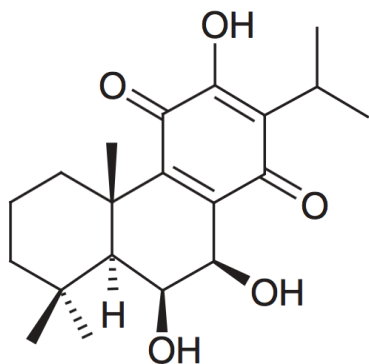


Figura 16- Estrutura química de 6 β ,7 β -dihidroxiroileanona (Kubínová et al., 2014).

Foi estudada a sua atividade antimicrobiana, onde se concluiu que tal como no diterpeno abietano 7 β -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, também é ativa contra as bactérias Gram-positivas *E. faecalis* e *S. aureus* (Kubínová et al., 2014).

Também se estudou a sua capacidade de inibir a BuChE e verificou-se novamente que, pelas mesmas razões previamente apresentadas no diterpeno abietano 7 β -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona, também este apresenta efetivamente atividade inibitória da BuChE (Kubínová et al., 2014).

Este diterpeno abietano também apresenta, segundo (Abdissa, Frese, & Sewald, 2017), atividade citotóxica moderada contra a linha celular KB-3-1 de carcinoma do colo do útero humano, comparando com o controlo positivo criptoficina-52 (Garcia et al., 2018).

3.3.1.4 7 α -formiloxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona e 7 α -acetoxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona

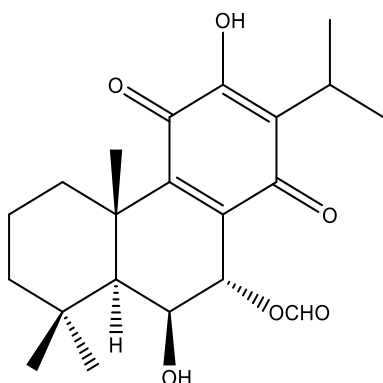


Figura 17- Estrutura química de 7 α -formiloxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona (Garcia et al., 2018).

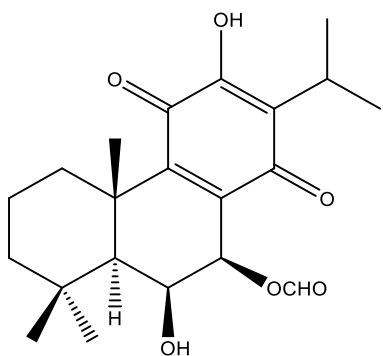


Figura 18- Estrutura química de 7 α -acetoxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona (Garcia et al., 2018).

Foi reportado que os diterpenos abietanos 7 α -formiloxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona (**Figura 17**) e 7 α -acetoxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona (**Figura 18**), foram testados para averiguar se possuem atividade contra a malária (Onguéné et al., 2013).

A malária é uma doença infecciosa provocada por um protozoário e que é transmitida por um vetor, a fêmea do mosquito do género *Anopheles*. Afeta principalmente as populações de África, Ásia e América Latina, e por si só, tem a capacidade de causar anualmente milhares de mortes. Esta doença representa um problema de saúde pública, devido à resistência aos fármacos utilizados para o seu tratamento, más condições de higiene, programas de controlo de vetores mal gerenciados e nenhuma vacina aprovada. Cinco espécies de protozoários do género *Plasmodium* (*Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium knowlesi*) são responsáveis pela infeção, embora a maioria dos casos fatais sejam causados por *Plasmodium falciparum*. Os medicamentos utilizados para o seu tratamento são a quinina, cloroquina, mefloquina, artemisinina e mais

recentemente uma combinação de atovaquona e proguanilo, com menores efeitos secundários reportados (Nogueira & Lopes, 2011; Onguéné et al., 2013; White, 2004). No entanto, os protozoários desenvolveram resistência contra muitos dos regimes de tratamento atuais (White, 2004).

Na busca pela identificação de novos agentes antimaláricos, muitos grupos de pesquisa recorreram a fontes vegetais, devido ao uso de muitas destas no tratamento de malária e febres na medicina tradicional africana, e como tal, tem havido um apelo geral para o uso de produtos naturais como fármacos para a malária, ou como fontes de inspiração para o desenvolvimento de novos antimaláricos, a fim de evitar problemas relacionados com a resistência aos medicamentos (Balunas & Kinghorn, 2005; Nogueira & Lopes, 2011; Onguéné et al., 2013).

Verificou-se que ambos os compostos apresentavam uma atividade significativa, sendo que o composto 7 α -formiloxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona revelou uma maior atividade do que o fármaco quinina. Quando combinado com a quinina, este composto interagiu com o fármaco de forma sinérgica. No entanto, o perfil de citotoxicidade indicou um baixo grau de especificidade em relação ao parasita da malária. Através dos resultados obtidos, é possível concluir que estes diterpenos abietanos poderão representar compostos promissores para o tratamento da malária (Onguéné et al., 2013).

De seguida, na **Tabela 3**, apresenta-se a informação resumida acerca de *P. hadiensis*, os respetivos compostos bioativos encontrados nesta planta, qual a sua atividade e qual o mecanismo de ação, se conhecido, que se pensa que seja o responsável por essa mesma atividade biológica.

Tabela 3- Informação resumida sobre *P. hadiensis*, quais os seus compostos com atividade biológica, o tipo de atividade biológica e o mecanismo de ação que se pensa ser o responsável por essa mesma atividade.

Espécie	Compostos com atividade biológica	Tipo de atividade biológica	Mecanismo de ação
<i>Plectranthus hadiensis</i>	7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (Figura 14)	Antitumoral	Efeito antiproliferativo-roileanona monomérica e acetilação que aumenta a lipofilicidade, facilitando a sua penetração no interior da membrana celular
		Imunomoduladora	Efeito antiproliferativo-grupo acetil no carbono 7 α , inibição do fator de transcrição NF-kB e inibição de IL-2
		Antimicrobiana	Presença de uma fração 12-hidroxi- <i>para</i> -benzoquinona no anel C simultaneamente com um anel B oxidado nos carbonos 6 e 7, existência de um padrão de substituição 6 β -hidroxil e 7 α -acetoxil, presença de um grupo acetoxi no carbono 7 conferindo lipofilicidade à molécula e existência de grupos funcionais hidrofílicos contendo oxigénio
	7 β -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (Figura 15)	Antimicrobiana	_____
		Inibição da BuChE	Presença de uma ligação éster
		Inibição da α -glucosidase	Ligação à enzima causando a sua inibição
	6 β ,7 β -dihidroxiroileanona (Figura 16)	Antimicrobiana	_____
		Inibição da BuChE	Presença de uma ligação éster
		Citotóxica	_____
	7 α -formiloxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona (Figura 17)	Antimalárica	_____
	7 α -acetoxi-6,12-dihidroxi-abieta-8,12-diene-11,14-diona (Figura 18)		_____

4. Atividades biológicas de *Plectranthus*

4.1 Atividade antioxidante

Os antioxidantes são vitais no combate aos radicais livres, que danificam as células humanas sob condições de stress oxidativo, e um desequilíbrio de radicais livres pode causar graves distúrbios no metabolismo celular. Os radicais livres são espécies instáveis porque possuem eletrões desemparelhados e buscam estabilidade através do emparelhamento com macromoléculas biológicas (Ozyurt, Demirata, & Apak, 2007; Rijo, 2010, p.37-38).

Os seres humanos são naturalmente expostos aos radicais livres, e como tal, a sua presença em níveis normais não é prejudicial, uma vez que no corpo humano existem numerosos processos fisiológicos e bioquímicos, com a capacidade de os gerar (Duracková, 2010). Estes processos metabólicos do próprio organismo podem levar à produção de radicais livres de oxigénio e outras espécies reativas de oxigénio (ERO) como subprodutos, como por exemplo, radicais peróxido, hidróxido e singlete de oxigénio, que são altamente tóxicos. Quando esta produção de radicais livres se torna excessiva, o organismo perde a capacidade de os eliminar, originando-se assim o stress oxidativo que poderá conduzir a danos oxidativos nas biomoléculas, como os lípidos, proteínas ou o ácido desoxirribonucleico (ADN), e consequentemente poderá originar doenças crónicas como aterosclerose, diabetes, cancro ou doenças degenerativas (Bonomini, Rodella, & Rezzani, 2015; Cai, Luo, Sun, & Corke, 2004; Duracková, 2010; Falé et al., 2009; Rijo, 2010, p.37-38). Além disso, especula-se também que os radicais livres sejam patologicamente importantes em vários processos neurodegenerativos, incluindo défices cognitivos e stress oxidativo, que está associado à patogénese da DA, e características celulares desta doença são causas ou efeitos do stress oxidativo (Ozyurt et al., 2007; Rijo, 2010, p.37-38).

Uma grande parte dos compostos bioativos isolados a partir de extratos vegetais são polifenóis, que têm a particularidade de possuírem uma elevada atividade antioxidante. Esta está muitas vezes relacionada com a capacidade destes compostos em recaptarem os radicais livres, que são formados durante um processo inflamatório (Cai et al., 2004; Falé et al., 2009; Ntungwe et al., 2017). Curiosamente, a ingestão de polifenóis através de dietas ricas em frutas, vegetais e bebidas como o vinho tinto, foi indicada para reduzir a incidência de certos distúrbios neurológicos relacionados com a idade, incluindo degeneração macular e demência. Portanto, os dados sugerem que o alto consumo alimentar ou suplementar de antioxidantes em pessoas, pode reduzir o risco de DA (Ozyurt et al., 2007; Rijo, 2010, p.37).

Como tal, tem-se vindo a perceber através de vários estudos realizados anteriormente, que estes compostos desempenham um papel importante na prevenção de várias doenças, uma vez que atuam como recaptadores de radicais livres, bloqueando os processos de oxidação que produzem estes mesmos radicais, estando desta forma associados a uma diminuição da taxa de doenças coronárias, do envelhecimento e até mesmo de alguns tipos de tumores. Deste modo, as plantas medicinais contendo elevados níveis de compostos fenólicos, apresentam um grande interesse e importância, uma vez que poderão ser uma potencial fonte de antioxidantes naturais, substituindo desta forma os antioxidantes sintéticos, como por exemplo, o butilhidroxitolueno (BHT) e o butilhidroxianisol (BHA), que possuem uma possível toxicidade contra o DNA animal, e apresentando-se como uma alternativa mais económica e eficaz (Cai et al., 2004; Djeridane et al., 2006; Muraina, Suleiman, & Eloff, 2009; Rijo, 2010, p.37-38; Rijo et al., 2012; Trouillas et al., 2003).

Os antioxidantes derivados de plantas exercem os seus efeitos aumentando os níveis de enzimas antioxidantes que têm a capacidade de neutralizar estas ERO, como a superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalases, ou então diminuindo os níveis de peróxidos lipídicos no sangue ou no fígado. Podem atuar tanto por eliminação de radicais livres, quenching de singletos de oxigénio, quelantes de metais de transição como o ferro, ou como agentes redutores e ativadores de sistemas de defesa antioxidante, para suprimir danos provocados pelos radicais no sistema biológico (Muraina et al., 2009; Rijo, 2010, p.37).

Em um estudo realizado por (Mothana et al., 2010), foi possível concluir que os extratos metanólicos de algumas plantas, entre elas *P. hadiensis*, possuem atividade antioxidante e mostraram alta atividade de remoção de radicais livres. A triagem fitoquímica demonstrou a presença de diferentes tipos de compostos como flavonóides, terpenóides e outros, que poderiam ser os responsáveis pelas atividades obtidas (Mothana et al., 2010; Rijo, 2010, p.39).

Também num estudo anteriormente realizado por (Kabouche, Kabouche, Öztürk, Kolak, & Topçu, 2007), em diterpenóides de extratos de plantas do género *Salvia*, que são quimicamente muito semelhantes às do género *Plectranthus*, concluiu-se que os diterpenos abietanos isolados destas, nomeadamente as estruturas de roleanonas, são antioxidantes promissores (Kabouche et al., 2007; Rijo, 2010, p.40).

4.2 Atividade antimicrobiana

As resistências criadas pelos microrganismos aos fármacos, principalmente por bactérias multirresistentes, é uma realidade cada vez mais presente, sendo que estas são uma das principais causas de morte em todo o mundo. Com o surgimento dos primeiros antibióticos, após a descoberta da penicilina, que desempenharam um papel igualmente importante na descoberta moderna e revolucionaram a medicina, foi possível salvar muitas vidas quer humanas, quer animais. Mas este feito também conduziu à sua utilização excessiva e indevida, como por exemplo, no tratamento de infeções virais, o que poderá ter contribuído significativamente para o início do surgimento destas resistências, sendo que a vancomicina se tornou o antibiótico de último recurso para o tratamento de infeções bacterianas causadas por bactérias Gram-positivas em hospitais. Após vários anos de uso, o surgimento de estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (SARV) nos Estados Unidos e multirresistentes deste organismo, assim como estirpes de ERV, tornaram-se uma ocorrência comum. Percebeu-se então desta forma, que a resistência é inevitável e que a gestão da mesma fará parte do processo para todos os novos antibióticos. Como tal, a procura contínua de alternativas terapêuticas com novos mecanismos de ação contra uma grande variedade de agentes patogénicos e com atividade potente, aliados a um ótimo índice terapêutico, torna-se cada vez mais necessária e urgente (Gibbons, 2008; Guimarães, Momesso, & Pupo, 2010; Pereira et al., 2015; Rijo, 2010, p.31; Rijo et al., 2012, 2013a, 2013b; Singh & Barrett, 2006).

Um exemplo de um microrganismo comensal já anteriormente referido, e que é muitas vezes responsável por causar infeções hospitalares, é o *S. aureus*. Algumas das estirpes desta bactéria são resistentes a antibióticos β -lactâmicos, nomeadamente as estirpes de SARM, que já são descritas de fontes clínicas há mais de quarenta anos. É a capacidade deste microrganismo Gram-positivo para adquirir resistência a praticamente todos os antibióticos úteis, que é a causa de preocupação considerável (Xiao, Mu, Shiu, Zeng, & Gibbons, 2007). Em 2002, a ocorrência de uma estirpe SARV totalmente resistente à vancomicina nos Estados Unidos, indicou que o tratamento bem-sucedido de estirpes de SARV pelo uso do antibiótico glicopeptídeo, não é garantido (Gibbons, 2004; Rijo, 2010, p.31-32).

Tal como em outras áreas de descoberta de fármacos, existem duas fontes principais de antibióticos- produtos naturais e compostos sintéticos. Os produtos naturais têm sido os pilares no fornecimento de novas estruturas químicas para muitos medicamentos, bem como em ligações que foram quimicamente modificadas e desenvolvidas como agentes antibacterianos. Geralmente possuem estruturas arquitetónicas complexas e grupos

funcionais densamente implantados, proporcionando desta forma um número máximo de interações com alvos moleculares, muitas vezes levando a uma excelente seletividade para patogénios *versus* o hospedeiro (Cordell, 2000; Gibbons, 2008; Rijo, 2010, p.31; Singh & Barrett, 2006; Xiao et al., 2007).

Num estudo realizado por (Gibbons, 2004), considerando a resistência a múltiplos fármacos, revelou a similaridade molecular desta, numa tentativa de encontrar algumas características comuns de inibidores estruturalmente não relacionados. A forma da molécula, os anéis aromáticos e a presença de alguns átomos polares, determinam a potência dos inibidores de resistências a múltiplos fármacos (Rijo, 2010, p.32-33).

As plantas medicinais têm sido utilizadas ao longo dos tempos pelos povos de países em desenvolvimento, na medicina tradicional e em cuidados de saúde primários, por isso, são reconhecidas como um recurso valioso de compostos antimicrobianos naturais, seguros e custo-efetivos, que podem levar a agentes terapêuticos novos e mais eficazes. Assim sendo, as espécies vegetais têm sido cada vez mais procuradas e alvos de estudo intenso como fontes de antimicrobianos, uma vez que as plantas biossintetizam produtos naturais como os metabolitos secundários, que estão envolvidos na defesa química contra os microrganismos que se encontram no seu meio ambiente, tentando de alguma forma combatê-los e prevenir a sua proliferação. Para além do mais, os metabolitos antimicrobianos naturais possuem estruturas químicas complexas, com elevada importância para as interações específicas e reconhecimento dos alvos macromoleculares de bactérias patogénicas (Pereira et al., 2015; Rijo et al., 2012, 2013a).

As espécies de *Plectranthus* não são desta forma exceção, uma vez que produzem metabolitos que são responsáveis pela utilização destas espécies como antimicrobianos, como os diterpenos, que são um dos maiores grupos de produtos naturais derivados de plantas com atividade anti-estafilocócica. Como tal, são fontes fundamentais de novas entidades químicas que se espera que sejam candidatas promissoras a medicamentos em importantes áreas terapêuticas, como as doenças infecciosas (Pereira et al., 2015; Rijo et al., 2012, 2013a; Ulubelen et al., 2002).

Um estudo de estrutura-atividade de diterpenóides antibacterianos (vários esqueletos de caurano, abietano, labdano e clerodano), realizado por (Urzúa, Rezende, Mascayano, & Vásquez, 2008), levou à identificação de alguns requisitos estruturais para a sua ação antimicrobiana e sugeriu dois requisitos estruturais para a atividade destes e outros compostos relacionados. Estas características estruturais incluem um sistema decalínico substituído, com capacidade de inserção numa região lipofílica, e um fragmento hidrofílico

que possui um grupo dador de ligações de hidrogénio, capaz de interagir com grupos aceitadores de ligações de hidrogénio na membrana. Estes requisitos estruturais são responsáveis por uma inserção ótima destes compostos nas membranas celulares, como sugerido pelos resultados da ancoragem de alguns deles num modelo de bicamada fosfolipídica. O mecanismo de ação dos terpenos como agentes antimicrobianos não é totalmente compreendido, mas especula-se que envolva a rutura das membranas pelos compostos lipofílicos. A análise das atividades antibacterianas em diterpenóides, oferece uma visão sobre os requisitos estruturais para a atividade antibacteriana destes compostos, e contribui para o futuro projeto de outras moléculas antibacterianas (Rijo, 2010, p.34; Urzúa et al., 2008).

4.3 Atividade antitumoral

Apesar do notável progresso no desenvolvimento de novos medicamentos terapêuticos, o cancro continua a ser uma das principais causas de morte no mundo (Amin, Gali-Muhtasib, Ocker, & Schneider-Stock, 2009; Gali-Muhtasib, Hmadi, Kareh, Tohme, & Darwiche, 2015; Garcia et al., 2018). Caracterizado biologicamente pela multiplicação anormal de células, os tumores são formados por células malignas, muitas vezes com capacidade metastática (Garcia et al., 2018; Greenwell & Rahman, 2015).

Os fármacos anticancerígenos usados em quimioterapia são biologicamente eficazes, mas os seus efeitos tóxicos inerentes ao hospedeiro já são descritos há muito tempo (Garcia et al., 2018; Plenderleith, MD, & FRCPC, 1990). Como tal, o objetivo final da atual terapia contra o cancro depende da morte seletiva de células cancerosas, sem causar qualquer toxicidade às células não tumorais (Garcia et al., 2018; Tewary, Gunatilaka, & Sayers, 2016).

A busca por compostos antitumorais está entre as principais causas que justificam estudos fitoquímicos. Embora alguns produtos naturais e vários compostos derivados de plantas, tenham sido aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico em quimioterapia, como os terpenóides citotóxicos, entre estes, o paclitaxel (**Figura 19**), que pode ser destacado como um dos diterpenos mais importantes e que é amplamente utilizado em quimioterapia para o tratamento de uma ampla gama de tumores sólidos, muitos destes fármacos apresentam padrões tóxicos e efeitos colaterais indesejáveis, e como tal, ainda há uma necessidade de procura de novos agentes antitumorais, nos quais as plantas desempenham um papel notável. Em particular, os diterpenos abietanos são estudados há muito tempo devido às suas atividades biológicas, nomeadamente o seu potencial antitumoral, citotóxico e antiproliferativo (Amin et al., 2009; Cragg & Newman, 2005; Demain & Vaishnav, 2011; Garcia et al., 2018; Podolski-Renic' et al., 2011).

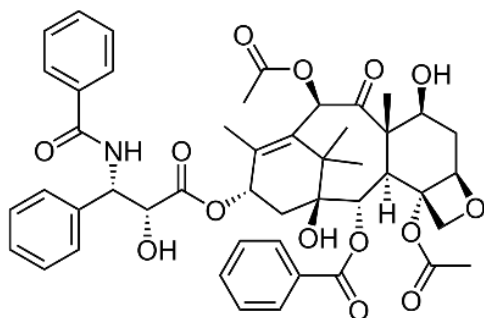


Figura 19- Estrutura química do paclitaxel (Garcia et al., 2018).

Os agentes citotóxicos podem induzir a morte celular por necrose ou apoptose. A necrose é um processo passivo, onde as células tipicamente incham rápido, perdem a integridade da membrana sofrendo lise, e libertam o seu conteúdo citoplasmático no meio circundante. Por outro lado, a apoptose é um processo ativo, ou seja, dependente de Adenosina Trifosfato (ATP), onde as células sofrem uma morte celular programada e se verificam alterações visíveis na sua membrana plasmática, existindo a formação de corpos apoptóticos que posteriormente são fagocitados pelos macrófagos. A morte celular por apoptose pode ser avaliada pela determinação dos biomarcadores caspases (Pasoski, 2009, p.26-27).

Existem atualmente poucos estudos relativamente aos mecanismos de morte celular provocados por diterpenos abietanos, mas parece que a maioria dos compostos testados quanto ao seu efeito em alvos envolvidos na morte celular, são capazes de induzir a morte celular através de mecanismos apoptóticos, nomeadamente, através da indução da cascata apoptótica dependente da caspase mitocondrial ou intrínseca (Garcia et al., 2018). Os diterpenos abietanos são capazes de induzir a apoptose principalmente através da via intrínseca. O seu mecanismo de ação é visto principalmente através da libertação do citocromo c da mitocôndria para o citosol, acompanhado pela ativação da caspase efetora 3, e um nível reduzido da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Akaberi, Mehri, & Iranshahi, 2014; Burmistrova et al., 2015; Garcia et al., 2018). Como tal, a desregulação das vias apoptóticas pode contribuir para o desenvolvimento de resistência à terapia do cancro, e desta forma, estas tornaram-se alvos interessantes ao desenvolver ou descobrir novos compostos com potencial anticancerígeno. Assim, como a apoptose requer a ativação de enzimas como as caspases proteases, estas são consequentemente implicadas como elementos-chave na terapia do cancro. No entanto, são ainda necessários mais estudos para que seja possível entender quais os mecanismos de ação e alvos celulares dos diterpenos abietanos (Garcia et al., 2018).

4.4 Atividade inibitória da AChE

O principal papel biológico da AChE é a terminação da transmissão do impulso nervoso nas sinapses colinérgicas, pela rápida hidrólise do neurotransmissor catiónico ACh. De acordo com a hipótese colinérgica, os défices de memória em pacientes com demência senil são devidos a uma deficiência seletiva e irreversível das funções colinérgicas no cérebro. Isso serve como uma razão para o uso de inibidores da AChE para o tratamento sintomático da DA, nos seus estágios iniciais (Ahmad et al., 2005; Rijo, 2010, p.41).

A DA é um distúrbio neurológico degenerativo, caracterizado por placas senis contendo proteína β -amilóide e perda de neurotransmissores colinérgicos no cérebro. A alteração bioquímica mais notável em pacientes com DA é uma redução dos níveis de ACh, no hipocampo e no córtex cerebral (Orhan et al., 2007; Rijo, 2010, p.42).

A inibição reversível da AChE é a principal estratégia terapêutica utilizada nas demências como a DA, e outras como a ataxia, miastenia gravis e doença de Parkinson (Colovic, Krstic, Lazarevic-Pasti, Bondzic, & Vasic, 2013; Rijo, 2010, p.42; Tabet, 2006).

Embora a AChE seja encontrada em todo o tecido excitável, seja nervoso ou muscular, e na maioria dos eritrócitos e tecido placentário, a BuChE está presente mais comumente no corpo, inclusive no SNC e Sistema Nervoso Periférico (SNP), fígado e plasma (Orhan et al., 2007; Rijo, 2010, p.42).

Um dos fármacos sintéticos mais utilizados para a terapêutica de disfunção cognitiva e perda de memória associadas à DA, é a tacrina (**Figura 20 a**), e também outro derivado de produtos naturais, a rivastigmina (**Figura 20 b**), mas uma vez que estes apresentam efeitos secundários graves, incluindo perturbações gastrointestinais e problemas associados à biodisponibilidade, torna-se cada vez mais necessária a procura de alternativas terapêuticas mais eficazes e com menores efeitos secundários (Rijo, 2010, p.42; Sung et al., 2002).

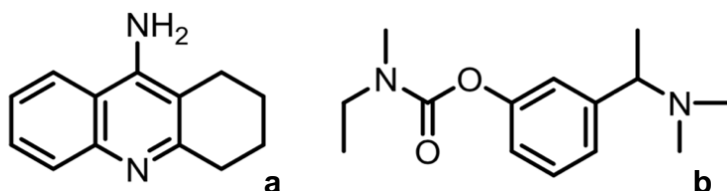


Figura 20- Estruturas químicas da tacrina (a) e da rivastigmina (b) (Rijo, 2010, p.42).

As espécies de *Plectranthus* poderão ser uma fonte essencial para a procura de novos compostos que tenham a capacidade de proteger os neurónios contra o stress oxidativo, e que consigam também inibir reversivelmente a AChE (Ntungwe et al., 2017).

Algumas espécies do género *Plectranthus* já tinham revelado em estudos anteriores, que possuem uma elevada capacidade de inibição da AChE. Este facto está relacionado com o elevado teor de ácido rosmarínico que algumas destas plantas apresentam, uma vez que se acredita que exista uma relação direta entre o teor de ácido rosmarínico contido numa planta e a capacidade de inibição da AChE que a mesma possui (Ntungwe et al., 2017).

Deste modo, a descoberta de novos inibidores da AChE pode contribuir para a conceção de novos fármacos, e fornecer informações que facilitarão a compreensão da interação entre os inibidores e a enzima (Ren, Houghton, Hider, & Howes, 2004; Rijo, 2010, p.43).

O presente trabalho teve como objetivo realizar uma pesquisa de atividade biológica de cinco espécies do género *Plectranthus*, sendo estas *P. hadiensis*, *P. inflexus*, *P. lippio*, *P. welshii* e *P. mzubulensis*.

Como tal, foram realizados para os cinco extratos acetónicos, ensaios de atividade antioxidante com o método de 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH), atividade antimicrobiana com o método de difusão em poços, toxicidade geral utilizando o modelo de *Artemia salina*, e a determinação do rendimento de extração através do método de ultrassons.

Posteriormente, apenas para o extrato acetónico de *P. hadiensis*, também foram realizados os ensaios de atividade antimicrobiana através do método de microdiluição, determinando-se os seus valores de Concentração Mínima Inibitória (CMI), Concentração Mínima Bactericida (CMB) e Concentração Mínima Fungicida (CMF), inibição da AChE *in vitro* com o método de Ellman e citotoxicidade com o ensaio de Sulforodamina B (SRB).

Por fim, procedeu-se ao estudo fitoquímico deste mesmo extrato, que consistiu no seu fracionamento e isolamento utilizando o método de Cromatografia de Camada Fina Preparativa (CCFP), seguido da identificação do(s) seu(s) composto(s) bioativo(s) através de métodos espectroscópicos.

Capítulo I: Parte experimental

1.1 Reagentes

Acetona, Dimetilsulfóxido (DMSO), Iodeto de acetilcolina e Etanol (Sigma). DPPH, Metanol, Quercetina, BHT, Vancomicina, Norfloxacin, Nistatina. Meios Agar *Mueller-Hinton* e *Sabouraud Dextrose* (Biokar Diagnostics). Tacrina, Tampão HEPES, Reagente de Ellman (Fluka Chemie AG). Sal com *Artemia* JBL, Ovos de *Artemia* JBL (JBL GmbH e Co. KG, D-67141 Neuhausen Alemanha). Sílica gel 60 PF₂₅₄ (Merck, Darmstadt, Alemanha). A revelação das placas de sílica foi feita através da sua pulverização com uma mistura de ácido sulfúrico/metanol (H₂SO₄/MeOH).

1.2 Materiais e equipamentos

Evaporador rotativo (K Ika-WERKE, GMBH & CO.KG; D-79219 Staufen Alemanha), Aparelho de ultrassons da VWR, Filtros Whatman papel N° 5 (Whatman, Inc., Clifton, NJ, USA), Espectrofotómetro U-1500 Hitachi Instruments Inc USA, Microplacas de 96 poços (Greiner Bio-one GmbH, Alemanha), Microplacas de 24 poços, Microscópio (OE, CETI Bélgica), Bomba de ar de aquário (HI-FLO[®] Single Type 4000), Termóstato AQUA LYTIC[®], Ressonância Magnética Nuclear Bruker (RMN 300 MHz). Sílica gel de CCF 60F₂₅₄ 20x20 (Merck KGaA).

1.3 Material vegetal

Todas as plantas do género *Plectranthus*, *P. hadiensis*, *P. inflexus*, *P. welshii*, *P. lippio* e *P. mzubulensis*, cresceram no Parque Botânico da Tapada da Ajuda, provenientes de porções de caules vindas do “Kirstenbosch National Botanical Gardens”, África do Sul, e foram recolhidas entre 2007 e 2008, sempre em Junho e Setembro, e variados espécimes foram depositados no Herbario “João de Carvalho e Vasconcellos” do “Instituto Superior de Agronomia”, Lisboa (LISI), Portugal.

1.4 Microrganismos e linhas celulares

Os microrganismos *E. faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ATCC 2601 e *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 10231, foram obtidos da *American Type Culture Collection* (ATCC). *S. aureus*- CIP106760, que é uma estirpe de SARM, foi obtida da *Collection of Institute Pasteur* (CIP).

As linhas celulares de carcinoma colorretal (HCT116), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e carcinoma do pulmão (NCI-H460), foram obtidas da ATCC e utilizadas no ensaio de citotoxicidade que foi realizado em parceria com o LAQV/REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob coordenação da Professora Doutora Lucília Saraiva.

1.5. Métodos

1.5.1 Preparação de extratos e rendimento de extração

Os cinco extratos foram preparados com uma concentração de 10% (m/v), utilizando-se o método de extração de ultrassons (Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2014).

Pesaram-se 3 g de planta seca na balança analítica, triturou-se no moinho e adicionou-se 30 mL de solvente extrator que foi a acetona (Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2014). Cada extração no aparelho de ultrassons foi feita durante cerca de 60 minutos a aproximadamente 25°C, sendo que depois se procedeu à filtragem usando papel de filtro (Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2014). Os extratos obtidos foram evaporados no evaporador rotativo a uma temperatura entre os 40 e os 50°C, seguidamente colocados em eppendorfs e dissolvidos em DMSO até perfazer uma concentração de 10 mg/mL (**Figura 21**) (Ntungwe et al., 2017).



Figura 21- Diferentes fases de preparação dos extratos e respetivo processo de extração (captado em 25/10/2016).

Calculou-se o rendimento de extração para cada um dos extratos, sendo que para cada extrato foram realizadas 3 extrações, utilizando-se sempre o mesmo procedimento (Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2014).

O rendimento de extração foi calculado através da utilização da fórmula seguinte (Ntungwe et al., 2017):

$$\text{Rendimento (m/m) (\%)} = \frac{\text{resíduo seco (g)}}{\text{planta seca (g)}} \times 100$$

1.5.2 Atividade antioxidante

1.5.2.1 Ensaio qualitativo

Para avaliar preliminarmente a capacidade de recaptação de radicais livres dos extratos, foi utilizado o método de radical DPPH em Cromatografia de Camada Fina (CCF) (Ntungwe et al., 2017).

Realizou-se uma CCF aplicando 10 µL de cada extrato (1 mg/mL) sobre uma placa de sílica gel, usando o correspondente solvente extrator, que neste caso foi a acetona. Após estarem secas, as placas foram pulverizadas com uma solução de DPPH 0,2% (v/v) em metanol e analisadas após 10 minutos (Ntungwe et al., 2017).

O controlo positivo utilizado foi a quercetina (1 mg/mL), devido à sua atividade antioxidante comprovada (Baghel, Shrivastava, Baghel, Agrawal, & Rajput, 2012), e o controlo negativo usado foi a acetona (Ntungwe et al., 2017).

1.5.2.2 Ensaio quantitativo

Para avaliar a capacidade de recaptação de radicais livres dos extratos, foi usado o método espectrofotométrico de DPPH. Os extratos acetónicos foram testados a uma concentração de 1 mg/mL e os testes foram realizados em triplicado (Ntungwe et al., 2017).

Foram adicionados 10 µL de extrato de planta (amostra) a 990 µL de solução de DPPH 0,2% (v/v) em metanol (Falé et al., 2009; Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2014).

Por fim, a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos, mediu-se a absorvância a 517 nm contra o branco correspondente e calculou-se a atividade antioxidante, através da seguinte fórmula (Falé et al., 2009; Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2014):

$$AA (\%) = \left(\frac{A_{DPPH} - A_{amostra}}{A_{DPPH}} \right) \times 100$$

Sendo que AA corresponde à atividade antioxidante, A DPPH é a absorvância do DPPH contra o branco, e A amostra corresponde à absorvância do extrato ou controlo contra o branco (Falé et al., 2009; Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2014).

O controlo positivo utilizado foi uma vez mais a quercetina (1 mg/mL), uma vez que esta apresenta atividade antioxidante comprovada (Baghel et al., 2012; Dawidowicz & Olszowy, 2010, 2011).

1.5.3 Atividade antimicrobiana

1.5.3.1 Método de difusão em poços

Para a pesquisa e seleção de novos compostos com atividade antimicrobiana, presentes nos extratos das espécies de *Plectranthus* em estudo, utilizou-se o método de difusão em poços (Ntungwe et al., 2017).

As estirpes microbianas utilizadas foram duas bactérias Gram-positivas (*E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 25923), duas bactérias Gram-negativas (*E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853) e duas leveduras (*S. cerevisiae* ATCC 2601 e *C. albicans* ATCC 10231) (Ntungwe et al., 2017).

Os extratos e as soluções *stock* dos antibióticos e antifúngico de referência ou controlos positivos- vancomicina para bactérias Gram-positivas, norfloxacin para bactérias Gram-negativas e nistatina para leveduras- foram preparados em DMSO (1 mg/mL). O controlo negativo utilizado em todas as estirpes microbianas foi o DMSO. O meio de cultura usado para bactérias foi o Agar *Mueller-Hinton* sólido e para leveduras *Sabouraud Dextrose* (Ntungwe et al., 2017).

Em condições de assepsia, inoculou-se nas placas de Petri que continham os meios de cultura, 0,1 mL de suspensão bacteriana de acordo com a escala 0,5 da solução de McFarland, e foram feitos poços, com uma pipeta de Pasteur de vidro esterilizada, onde se colocaram 50 µL de cada extrato e dos respetivos controlos positivo e negativo (Ntungwe et al., 2017).

Por fim, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas, e a atividade antimicrobiana foi avaliada através da medição em mm do diâmetro dos halos de inibição formados à volta de cada poço contendo os extratos, comparando-os com o diâmetro dos halos de inibição formados à volta dos poços que contêm os respetivos controlos positivo e negativo (Ntungwe et al., 2017).

1.5.3.2 Método de microdiluição (avaliação dos valores de CMB, CMF e CMI)

Uma vez que o extrato de *P. hadiensis* apresentou a maior bioatividade contra as estirpes de *S. aureus* e *C. albicans* no método de difusão em poços, calculou-se posteriormente as suas CMB, CMF e CMI, através do método de microdiluição descrito pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (Clinical & Laboratory Standards Institute [CLSI], 2003)*.

As estirpes microbianas utilizadas foram duas bactérias Gram-positivas (*S. aureus*-CIP106760 que é uma estirpe de SARM e *S. aureus* ATCC 25923) e uma levedura (*C. albicans* ATCC 10231) (Ntungwe et al., 2018).

Os meios de cultura utilizados para bactérias e leveduras foram os mesmos utilizados no procedimento do ponto 1.5.3.1 (página 64), assim como o controlo negativo. O controlo positivo utilizado para *S. aureus* e *S. aureus*-CIP106760 foi a vancomicina, e para *C. albicans*, a anfotericina B (Ntungwe et al., 2018).

Em condições de assepsia, colocou-se 100 µL de meio em cada poço, em microplacas de 96 poços. O primeiro poço contém 100 µL de cada amostra de extrato, controlo positivo e negativo (1 mg/mL). Realizou-se uma série de microdiluição de 1:2 e colocou-se 10 µL de uma suspensão bacteriana padronizada correspondente a 0,5 McFarland, de cada microrganismo, em todos os poços. Por fim, as microplacas foram postas a incubar a 37°C durante 24 horas (Ntungwe et al., 2018).

O valor da CMI foi calculado após não se detetar mais nenhum crescimento microbiano nos poços da microplaca, e de seguida, retirou-se 10 µL de amostra da microplaca e semeou-se numa placa de Petri para verificar as CMB e CMF, que foram determinadas quando não havia crescimento microbiano visível nas placas. Cada medição foi realizada em triplicado (Ntungwe et al., 2018).

1.5.4 Toxicidade geral- ensaio de letalidade em *Artemia salina*

Antes da realização do ensaio, os ovos de *Artemia salina* foram postos a crescer para se transformarem em náuplios, e como tal, são colocados numa solução salina que consiste em 500 mL de água da torneira com três colheres de sal (Ntungwe et al., 2017; Sarah, Anny, & Misbahuddin, 2017).

Há parâmetros importantes que devem ser respeitados e que influenciam a eclosão dos ovos, como o pH da água a 8.0, a presença de oxigénio, uma temperatura entre 28-30°C e a presença de agitação, utilizando-se para tal uma bomba de aquário que permite que os ovos se mantenham em contínuo movimento (Hamidi, Jovanova, & Panovska, 2014; Sarah et al., 2017).

O DMSO, que é o controlo negativo do solvente, foi testado nas concentrações (1000; 100; 10; 1; 0,1 mg/L), conseguindo-se então perceber qual a concentração de DMSO e de extrato mais adequadas para serem utilizadas no presente ensaio, sendo a mais adequada 10 mg/L. Os cinco extratos tinham uma concentração inicial de 10000 mg/L e foram diluídos para uma concentração de 10 mg/L com DMSO. O DMSO é também posteriormente diluído na solução salina a uma concentração de 10 mg/L (Ntungwe et al., 2017). O controlo positivo utilizado neste tipo de ensaios é o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e a solução salina é o controlo negativo do meio (Bueno & Piovezan, 1982; Hocayen, Campos, Pochapski, & Malfatti, 2012).

Após 24 horas, procede-se à contagem do número de náuplios de *Artemia salina* mortos, com a ajuda de um microscópio ótico (Ntungwe et al., 2017). Depois adiciona-se 100 µL de $K_2Cr_2O_7$ (100 mg/mL), e de seguida conta-se novamente o número de náuplios mortos (Ntungwe et al., 2017).

A percentagem de mortes de náuplios de *Artemia salina*, foi calculada para cada extrato, utilizando a seguinte fórmula (Ntungwe et al., 2017):

$$\text{Mortes de náuplios de } Artemia \text{ salina } (\%) = \frac{\text{Náuplios totais} - \text{Náuplios vivos}}{\text{Náuplios totais}} \times 100$$

Escolheram-se posteriormente os dois extratos acetónicos mais ativos (*P. hadiensis* e *P. inflexus*), que de seguida foram testados novamente a uma gama de concentrações entre 0,01 e 1 mg/L, para se determinar a sua concentração letal média (CL_{50}) em mg/L, após 24 horas (Ntungwe et al., 2017).

1.5.5 Citotoxicidade

Como o extrato de *P. hadiensis* apresentou o maior valor de toxicidade geral no ensaio de letalidade em *Artemia salina*, testou-se a sua citotoxicidade em linhas celulares tumorais humanas de carcinoma colorretal (HCT116), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e carcinoma de pulmão (NCI-H460) (Ntungwe et al., 2018).

Este ensaio foi realizado em parceria com o LAQV/REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob coordenação da Professora Doutora Lucília Saraiva.

Para tal, utilizando-se o ensaio de SRB, as células foram expostas a diluições seriadas do extrato acetónico, e o seu efeito foi analisado após 48 horas de incubação (Leão et al., 2015; Ntungwe et al., 2018; Soares et al., 2014).

As células foram fixadas às placas de cultura de tecidos com ácido tricloroacético (TCA) a 10%, as placas foram coradas com SRB a 0,4% e lavadas com ácido acético a 1%. O corante ligado foi então solubilizado com 10 mM de tampão Tris e a absorvância foi medida a 510 nm num leitor de microplacas. O controlo positivo utilizado para as linhas celulares MCF-7 e HCT116 foi a doxorubicina, e para a linha celular NCI-H460, o paclitaxel. Por fim, calculou-se a concentração de extrato que induz 50% de inibição do crescimento celular, ou seja, a concentração inibitória média (CI₅₀) em µg/mL (Leão et al., 2015; Ntungwe et al., 2018; Soares et al., 2014).

1.5.6 Ensaio de inibição da AChE *in vitro*

No ensaio para determinar a inibição da atividade enzimática da AChE, utilizou-se o método de Ellman, avaliando-se apenas o extrato mais bioativo selecionado anteriormente, o extrato acetónico de *P. hadiensis* (0,1 µg/mL). Os testes foram realizados em triplicado, utilizando-se a tacrina como controlo positivo (Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2014).

Utilizou-se um leitor de microplacas onde se colocou 90 µL de tampão Tris-HCl, 30 µL de amostra e 7,5 µL de solução de AChE. Depois deixou-se a incubar durante 15 minutos e adicionou-se 22,5 µL de uma solução de inibidor da AChE (0,023 mg/mL) e 142 µL de Reagente de Ellman (DTNB). Após a reação enzimática ter atingido o equilíbrio, os valores de absorvância foram medidos a 405 nm. Realizou-se também uma reação de controlo usando água em vez de extrato, e para o branco utilizou-se o tampão Tris-HCl em vez da solução enzimática (Falé et al., 2009).

Posteriormente foi possível calcular a percentagem de inibição da AChE, utilizando as fórmulas seguintes (Ntungwe et al., 2017):

$$\text{Velocidade da reação do controlo ou inibidor} = \frac{\text{Absorvância corrigida (nm)}}{\text{Tempo (min)}}$$

$$\text{Inibição da AChE (\%)} = 100 - \left(\frac{100 \times \text{Velocidade da reação do inibidor}}{\text{Velocidade da reação controlo}} \right)$$

1.5.7 Estudo fitoquímico do extrato bioativo de *P. hadiensis*

O extrato acetónico de *P. hadiensis* foi preparado de acordo com o procedimento do ponto 1.5.1 (página 61), onde foram utilizados 1,7112 g de planta seca. O fracionamento e isolamento foram realizados por CCFP utilizando-se o eluente hexano: acetato de etilo (80:20 v/v), seguidos de desadsorção da sílica das frações obtidas, usando um sistema de filtração a vácuo.

Neste trabalho foram realizados no total 2 fracionamentos cromatográficos por ordem crescente de polaridade. O primeiro, que foi um fracionamento preliminar em pequena escala para ensaios biológicos, de modo a se conseguir selecionar a fração mais bioativa, e de onde se obtiveram 3 frações (A, B e C). No segundo fracionamento foram obtidas 4 frações (F1, F2, F3 e F4), onde já era conhecida a fração mais bioativa que seguiu para o isolamento.

A partir do primeiro fracionamento, preparou-se posteriormente 10 mg/mL de extrato de *P. hadiensis* e testou-se a atividade antimicrobiana dos compostos de cada fração A, B e C, contra as mesmas estirpes microbianas e de acordo com o procedimento do ponto 1.5.3.1 (página 64). Resultante do segundo fracionamento, é possível concluir que a fração F2 está pura, uma vez que a sua CCF apresenta apenas uma mancha, e como tal, procedeu-se à identificação do(s) composto(s) presente(s) na mesma, recorrendo-se à técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogénio (^1H -RMN) e de carbono (^{13}C -RMN). A obtenção do espectro de ^{13}C -RMN foi realizada posteriormente, em parceria com a Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

O espectro de ^1H -RMN foi obtido usando um Bruker 300 MHz, CDCl_3 (clorofórmio deuterado). As amostras foram secas numa bomba Buchi, dissolvidas em CDCl_3 e referenciadas a uma ressonância de δ 7.26 ppm. ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) δ 7.26, 7.19(1H,s, -OH), 5.66 (1H,s,7 β -H), 4.32 (1H,s,H-6), 3.17 (1H, sept, J = 7.5, H-15), 2.62 (1H,s,H-1 β), 2.17 (1H,s,6 β -OH), 2.04 (3H,s,OAc-7 α), 1.83 (1H,s,2 β -H), 1.59 (3H,s,Me-20), 1.54 (1H,s,2 α -H), 1.47 (1H,s,3 β -H), 1.35 (2H,s,5 α -H), 1.21 (3H,s,Me-19), 1.19 (2H,s,Me-16,Me-17), 0.95 (4H,s,Me-18) (Ntungwe et al., 2018).

O espectro de ^{13}C -RMN foi obtido usando um Bruker 125 MHz, CDCl_3 . As amostras foram secas numa bomba Buchi, dissolvidas em CDCl_3 e referenciadas a uma ressonância de δ 77.2 ppm. ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) δ 185.89 (C14), 182.99 (C11), 169.70(7 α -COCH₃), 150.05(C12), 150.04 (C9), 136.99 (C8), 124.76 (C13), 68.89(C7), 67.07(C6), 49.92 (C5), 42.43 (C3), 38.85 (C10), 38.46 (C1), 33.84 (C4), 33.78 (C18), 24.35 (C15), 21.69 (C2), 21.06 (7 α -COCH₃), 19.88 (C17, C16) (Ntungwe et al., 2018).

Capítulo II: Resultados e Discussão

2.1 Preparação de extratos e rendimento de extração

Existem vários métodos de extração de compostos bioativos a partir de produtos naturais, que podem ser utilizados. Os convencionais como a decocção, a extração com refluxo térmico, a extração utilizando o aparelho de Soxhlet e a infusão, e os não convencionais como o ultrassons, micro-ondas e extração com fluidos supercríticos. A sua escolha é muito importante, uma vez que poderá influenciar a quantidade obtida no extrato de compostos biologicamente ativos (Rijo et al., 2014; Yang, Wei, & Huang, 2012). Como muitas vezes estes mesmos compostos estão presentes nas plantas em concentrações muito pequenas, é fundamental que o método de extração utilizado seja eficaz e que permita de uma forma seletiva, maximizar a extração dos compostos pretendidos (Yang et al., 2012).

Alguns dos métodos de extração convencionais apresentam algumas desvantagens, como o facto de requerem um grande volume de solvente extrator, a obtenção de um rendimento baixo, demorarem muito tempo ou até mesmo poderem levar à perda de compostos com características termolábeis. Por conseguinte, torna-se indispensável a procura de métodos alternativos de extração que sejam mais rápidos, simples e eficientes (Yang et al., 2012).

O rendimento de extração das cinco espécies de *Plectranthus* estudadas, está representado na **Figura 22**. De todos os cinco extratos testados, é notório que o extrato acetónico de *P. hadiensis* é o que apresenta um maior rendimento de extração (13,49% m/m), seguido por *P. inflexus* (10,97% m/m), enquanto que *P. welshii* obteve o resultado mais baixo (2,15% m/m). O resultado obtido por *P. hadiensis* poderá estar relacionado com a maior extensão da rutura celular do material vegetal e que provavelmente se deve à técnica de extração utilizada, de ultrassons, que irá causar a migração de compostos a partir do material vegetal, proporcionando um extrato enriquecido em comparação com os outros extratos em estudo (Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2014).

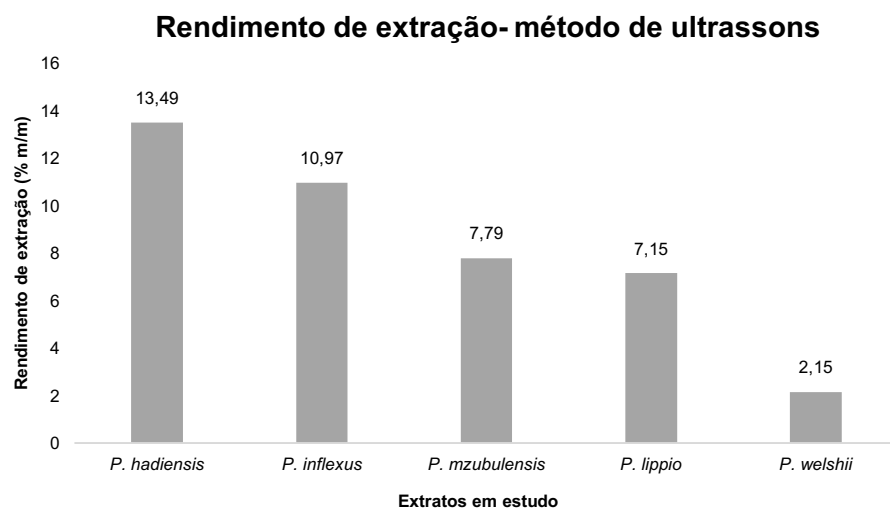


Figura 22- Resultados obtidos para o rendimento de extração (resíduo seco % m/m) das cinco espécies de *Plectranthus* em estudo.

2.2 Atividade antioxidante

2.2.1 Ensaio qualitativo

Um dos métodos que podem ser utilizados para avaliar a atividade antioxidante dos extratos, ou seja, a capacidade que estes têm de recaptar radicais livres, é o método do radical DPPH, sendo que no caso de um ensaio qualitativo, utiliza-se o ensaio de descoloração de radical DPPH em CCF. Este ensaio qualitativo é um método de rastreio rápido, realizado geralmente antes do quantitativo, com o objetivo de se conseguir obter uma avaliação preliminar da capacidade antioxidante dos compostos orgânicos (Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2012).

O DPPH é um radical livre estável, que quando reage com um composto antioxidante, consegue doar hidrogénio e é reduzido (**Figura 23**). Como resultado, apresenta uma mudança de cor que pode ir de um violeta escuro até um amarelo claro. Devido a este facto, o DPPH é amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante qualitativa, de uma forma rápida e eficaz (Miliauskas, Venskutonis, & Van Beek, 2004; Rijo et al., 2012).

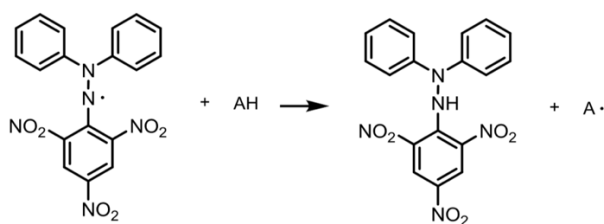


Figura 23- Reação do radical livre DPPH com um antioxidante (Rijo, 2010, p.152).

Os extratos com capacidade de reduzir o radical DPPH desenvolveram manchas amarelas contra um fundo violeta, sendo que quanto mais intensa for a cor amarela, maior a atividade antioxidante do extrato (Rijo et al., 2012). Nos resultados obtidos deste ensaio, todos os extratos estudados produziram resultados positivos (Ntungwe et al., 2017). O extrato que apresenta uma maior atividade antioxidante é o extrato de *P. hadiensis*, e o que apresenta menor atividade é o extrato de *P. lippio*, quando comparados com o controlo positivo quercetina. Desta forma, os resultados obtidos neste ensaio fazem prever que o extrato de *P. hadiensis* deverá ser aquele que irá apresentar o valor mais elevado de % de atividade antioxidante no ensaio quantitativo, assim como o extrato de *P. lippio* será o que irá apresentar um valor de % de atividade antioxidante mais baixo.

2.2.2 Ensaio quantitativo

Para avaliar a capacidade de recaptação de radicais livres dos extratos, pode ser usado o método de DPPH, mas realizando-se um ensaio quantitativo para que seja possível confirmar os resultados observados no ensaio qualitativo, anteriormente realizado (Falé et al., 2009; Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2012). O método espectrofotométrico para avaliar a atividade antioxidante total, é baseado na monitorização da diminuição da absorvância do radical DPPH, na presença de antioxidantes (Ntungwe et al., 2017).

O DPPH é caracterizado como um radical livre estável, tal como já referido anteriormente, devido à deslocalização do eletrão livre sobre a molécula. Assim, esta não pode dimerizar como aconteceria com outros radicais livres. A deslocalização dá origem a uma cor violeta caracterizada por uma banda de absorção a cerca de 517 nm. Quando uma solução de DPPH é misturada com uma substância que pode doar um átomo de hidrogénio, a forma reduzida é gerada acompanhada da perda da cor violeta (Pisoschi, Cheregi, & Danet, 2009; Rijo, 2010, p.152).

Através dos resultados obtidos, representados na **Figura 24**, é possível concluir que todos os extratos possuem atividade antioxidante, sendo que o extrato que possui maior atividade é *P. hadiensis* (36,24%), o que coincide com os resultados obtidos no ensaio qualitativo. *P. inflexus* obteve o menor resultado (0,16%), o que já não coincide com os resultados obtidos no ensaio qualitativo, visto que o extrato de *P. lippio* foi que obteve a menor atividade antioxidante no ensaio qualitativo, mas curiosamente foi o segundo mais bioativo no ensaio quantitativo (30,50%) (Ntungwe et al., 2017).

Embora os resultados obtidos de atividade antioxidante tenham sido moderados, quando comparados com o controlo positivo quercetina (99,47%), é possível concluir, coincidentemente com estudos já anteriormente realizados em outras espécies de *Plectranthus*, que estas mostram alguma capacidade de recaptação de radicais livres (Ntungwe et al., 2017, 2018; Rijo et al., 2012). Inclusivamente, a presença de diferentes tipos de compostos nestas plantas como os flavonóides, terpenóides dentro dos quais os diterpenos abietanos, mais concretamente as estruturas de roileanonas, entre outros, poderão ser os responsáveis pelas atividades obtidas (Kabouche et al., 2007; Mothana et al., 2010; Rijo, 2010, p.39-40).

Pensa-se que os antioxidantes derivados de plantas exercem os seus efeitos de várias formas, através do aumento dos níveis de enzimas antioxidantes com capacidade de neutralização de ERO, diminuição dos níveis de peróxidos lipídicos no sangue, eliminação de

radicais livres, ou também podem funcionar como agentes redutores e ativadores de sistemas de defesa antioxidante no sistema biológico (Muraina et al., 2009; Rijo, 2010, p.37).

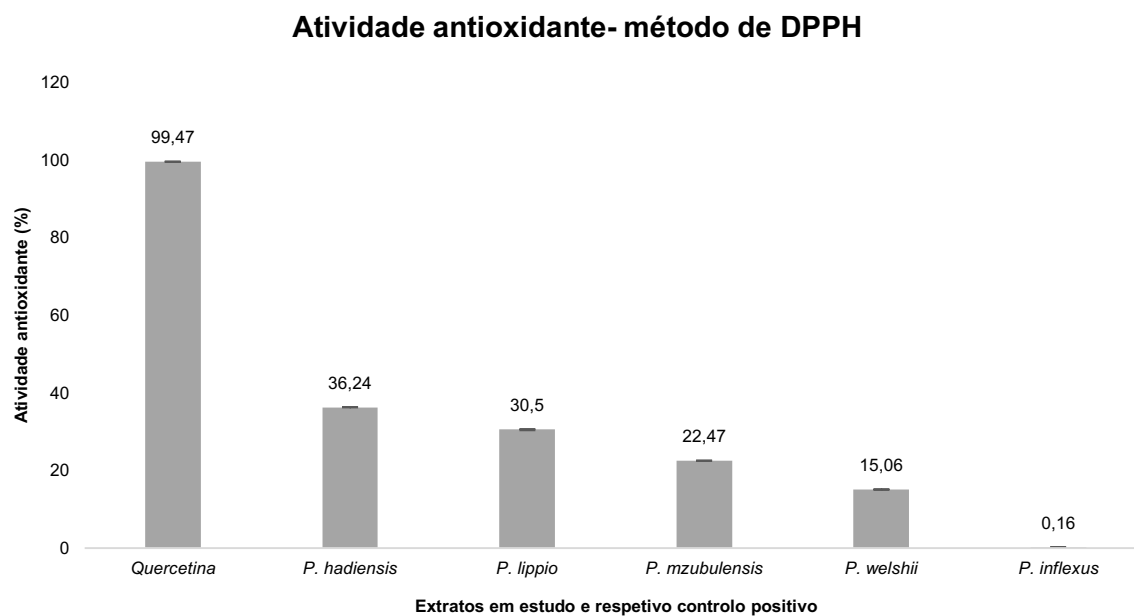


Figura 24- Resultados obtidos para a atividade antioxidante dos cinco extratos de *Plectranthus* em estudo.

2.3 Atividade antimicrobiana

2.3.1 Método de difusão em poços

Existem várias metodologias que podem ser utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana, sendo que os métodos de difusão assim como os de bioautografia, são conhecidos como métodos preliminares, uma vez que apenas fazem uma previsão se estamos perante uma substância com presença ou ausência de atividade antimicrobiana (Pereira et al., 2015; Valgas, Souza, Smânia, & Jr., 2007).

A metodologia escolhida para a avaliação preliminar da atividade antimicrobiana dos extratos neste estudo, foi o método de difusão em poços, que surgiu de uma modificação mais económica do método de difusão em discos, uma vez que este último apesar de ser um método simples, apresenta algumas desvantagens, como por exemplo, o facto de alguns agentes antifúngicos não estarem disponíveis em disco e também, pelos discos serem caros e de difícil aquisição em países em desenvolvimento. O procedimento é muito semelhante ao método original, apenas com a diferença dos discos serem substituídos por diluições do composto, que são colocadas em poços que foram cortados do agar. Este teste é simples, barato e confiável, uma vez que apresenta geralmente resultados comparáveis com o método de difusão em discos (Balouiri, Sadiki, & Ibsouda, 2016; Magaldi et al., 2004).

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada contra duas estirpes de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*), duas estirpes de bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e duas estirpes de leveduras (*S. cerevisiae* e *C. albicans*) (Ntungwe et al., 2017).

Os resultados obtidos representados na **Figura 25**, permitiram concluir que *P. hadiensis* foi o extrato mais ativo. Apresentou uma atividade antimicrobiana moderada contra *C. albicans* (11 mm), e uma atividade antimicrobiana significativa contra *S. aureus* (15 mm). O extrato de *P. mzubulensis* revelou atividade antimicrobiana moderada contra *S. aureus* (10 mm) e contra *C. albicans* (10 mm), e os restantes três extratos, apresentaram também apenas atividade antimicrobiana moderada contra *C. albicans* (10 mm). No entanto, nenhum dos extratos mostrou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, apresentando zonas de inibição idênticas às obtidas com o controlo negativo DMSO (5 mm), tal como acontecia com outros extratos de *Plectranthus* já anteriormente estudados (Ntungwe et al., 2017).

Outros estudos realizados nas plantas do género *Plectranthus*, descrevem alguns metabolitos secundários que estas produzem e que estão envolvidos na defesa química contra os microrganismos que se encontram no seu meio ambiente, tentando de alguma forma, combatê-los e prevenir a sua proliferação. Estes são, por exemplo, os compostos como os abietanos do tipo roileanonas, que são um dos maiores grupos de produtos naturais derivados de plantas com atividade anti-estafilocócica, compostos fenólicos (ácido rosmarínico), óleos essenciais e flavonóides, que se pensa serem os responsáveis pela atividade antimicrobiana. Como tal, para além das roileanonas que já se sabe que existem na composição do extrato de *P. hadiensis*, este poderá também ser rico em alguns dos outros compostos (Abdel-Mogib, Albar, & Batterjee, 2002; Grayer et al., 2010; Kubínová et al., 2014; Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2012, 2013a).

Também têm sido feitos estudos nestes compostos, nomeadamente de estrutura-atividade, no sentido de se perceber quais são os requisitos estruturais para a sua ação antimicrobiana, concluindo-se que possuem uma estrutura que tem capacidade de inserção numa região lipofílica e um fragmento hidrofílico que possui um grupo dador de ligações de hidrogénio, capaz de interagir com grupos aceitadores de ligações de hidrogénio na membrana, permitindo desta forma que haja uma inserção ótima destes compostos nas membranas celulares. O mecanismo de ação dos terpenos como agentes antimicrobianos não é totalmente compreendido, mas especula-se que envolva a rutura das membranas pelos compostos lipofílicos (Rijo, 2010, p.34; Urzúa et al., 2008).

No entanto, também é importante referir que a atividade antimicrobiana demonstrada pelo extrato de *P. hadiensis*, poderá derivar do facto de este apresentar uma elevada toxicidade.

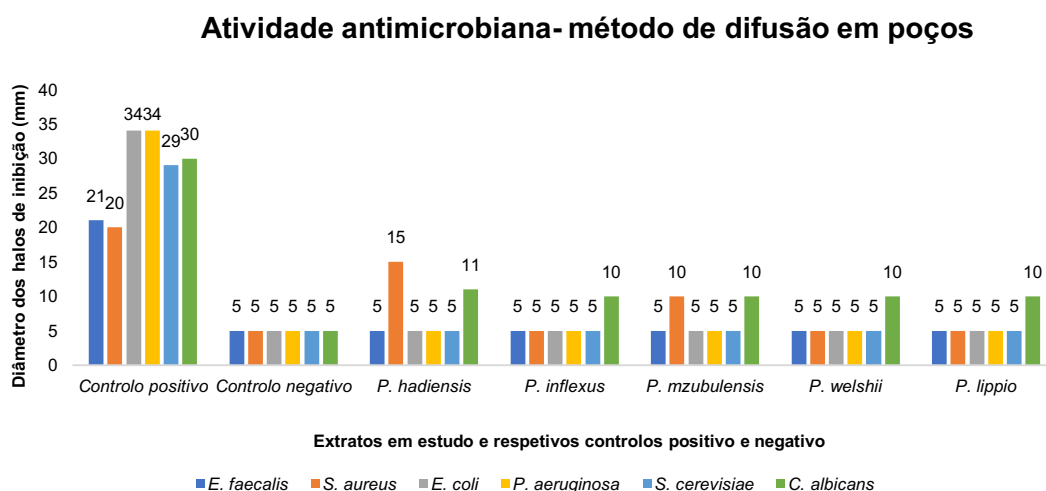


Figura 25- Resultados obtidos para a atividade antimicrobiana dos cinco extratos de *Plectranthus* em estudo.

2.3.2 Método de microdiluição (avaliação dos valores de CMB, CMF e CMI)

Outra das metodologias que podem ser utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana, são os métodos de diluição, que são chamados de métodos quantitativos, pois a partir destes é possível determinar os valores de CMI, CMB e CMF (Pereira et al., 2015; Valgas et al., 2007), uma vez que permitem calcular a concentração dos agentes antimicrobianos testados (Balouiri et al., 2016; Pfaller, Sheehan, & Rex, 2004). O valor de CMI é definido como a menor concentração de agente antimicrobiano utilizado, que inibe o crescimento visível do microrganismo testado e, por outro lado, o valor de CMB e CMF pode ser definido como a menor concentração de agente antimicrobiano necessária para matar 99,9% do inóculo final (Balouiri et al., 2016; Pfaller et al., 2004).

Os métodos de diluição podem ainda ser divididos em métodos de macro e microdiluição. O método de microdiluição apresenta-se como sendo muito mais vantajoso em relação ao de macrodiluição, uma vez que possui uma maior reprodutibilidade e a economia de reagentes e espaço que ocorre devido à realização do teste numa escala muito menor (Balouiri et al., 2016; Jorgensen & Ferraro, 2009).

Existem muitas normas aprovadas para a realização deste tipo de testes, mas as mais conhecidas são normalmente providenciadas pelo CLSI e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), que seguem um procedimento uniforme e acessível de ser realizado em quase todos os laboratórios de microbiologia clínica. Os valores de CMI podem ser influenciados por vários fatores como o tamanho do inóculo, o tipo de meio de crescimento, o tempo de incubação e o método de preparação do inóculo. O método de diluição utilizado pelo CLSI está padronizado para testar bactérias aeróbias, leveduras e fungos filamentosos (Balouiri et al., 2016; CLSI, 2003; Pfaller et al., 2004).

O método de diluição utilizado pela EUCAST é muito semelhante ao do CLSI, com modificações em alguns parâmetros do teste, como a preparação e tamanho do inóculo, e método de leitura da CMI, que é visual no ensaio CLSI e espectralfotométrico no EUCAST (Arikan, 2007; Balouiri et al., 2016; CLSI, 2003).

Uma vez que o extrato acetónico de *P. hadiensis* foi o que apresentou uma maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e leveduras, no método de difusão em poços realizado anteriormente, determinou-se os seus valores de CMI, CMB e CMF contra *S. aureus*, *S. aureus*-CIP106760 e *C. albicans* (Ntungwe et al., 2018).

Neste ensaio, os valores de CMI, CMB e CMF do extrato de *P. hadiensis*, foram determinados pela técnica de microdiluição proposta pelo CLSI (Ntungwe et al., 2018).

Através dos resultados obtidos apresentados na **Figura 26**, pode-se concluir que o extrato de *P. hadiensis* possui valores de CMI superiores aos controlos positivos, o que significa que a atividade inibitória do extrato não é superior à dos antibióticos e antifúngicos utilizados. Segundo (Kuetze, 2017), para estudos realizados em amostras de especiarias e vegetais, o extrato de *P. hadiensis* inibe moderadamente tanto o crescimento de *S. aureus* como o de *C. albicans*, uma vez que para valores de CMI entre 10 e 100 µg/mL a inibição é moderada, e para *S. aureus* o valor de CMI foi de 15,62 µg/mL e para *C. albicans* o valor de CMI foi de 62,5 µg/mL. Já para *S. aureus*-CIP106760, o valor de CMI foi de 3,91 µg/mL, o que faz com que o extrato de *P. hadiensis* tenha uma atividade inibitória significativa para *S. aureus*-CIP106760, pois para valores de CMI entre 1 e 10 µg/mL a inibição é significativa (Bona, Pinto, Fruet, Jorge, & Moura, 2014; Kuetze, 2017; Ntungwe et al., 2018). Já para os valores de CMB e de CMF do extrato de *P. hadiensis*, para *S. aureus* e *S. aureus*-CIP106760 os valores obtidos foram de >250 µg/mL, e para *C. albicans*, o valor foi de 62,5 µg/mL. Conclui-se que o extrato de *P. hadiensis* é bacteriostático, uma vez que os valores obtidos de CMB do mesmo, são muito superiores aos seus valores de CMI para as bactérias *S. aureus* e *S. aureus*-CIP106760, logo o extrato tem a capacidade de inibir o seu crescimento, mas não de as matar. Por outro lado, o extrato é fungicida, uma vez que o seu valor obtido de CMF para *C. albicans* é o mesmo que o obtido para a CMI deste mesmo microrganismo, logo tem a capacidade de inibir o seu crescimento e ao mesmo tempo de o matar.

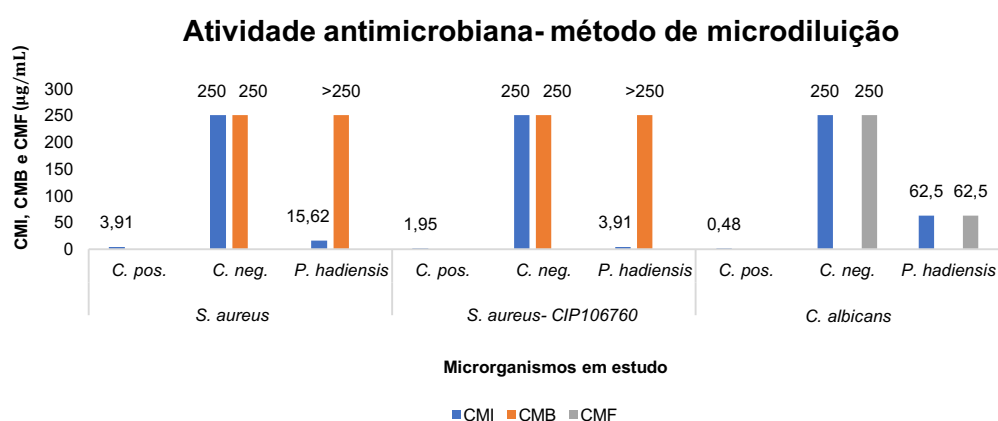


Figura 26- Resultados obtidos para os valores de CMI (µg/mL), CMB (µg/mL) e CMF (µg/mL) para o extrato acetónico de *P. hadiensis*. C. pos.: Controlo positivo; C. neg.: Controlo negativo.

2.4 Toxicidade geral- ensaio de letalidade em *Artemia salina*

O ensaio de letalidade usando como modelo um pequeno crustáceo, a *Artemia salina*, baseia-se na habilidade para matar *Artemia salina* cultivada em laboratório, e tem como objetivo a pesquisa e avaliação preliminar da toxicidade de todos os extratos vegetais preparados neste estudo (Chen, Guo, & Kong, 2012; Karchesy, Kelsey, Constantine, & Karchesy, 2016).

Embora este método não forneça qualquer informação adequada sobre o mecanismo de ação responsável pela toxicidade, é um método muito útil para a avaliação do potencial tóxico de vários extratos vegetais (Hamidi et al., 2014), sendo um indicador de potencial atividade antitumoral, inseticida e fungicida (Karchesy et al., 2016).

Devido à questão principalmente da ética, mas também económica nos ensaios toxicológicos, a *Artemia salina* é uma boa alternativa que substitui outros modelos animais utilizados neste tipo de testes, como por exemplo, os murganhos, que foram usados durante muitos anos porque apresentam uma elevada correlação com os seres humanos. Este ensaio parece ser uma solução apropriada, especialmente porque pode ser classificado como ensaio *in vivo*, e por outro lado, até já se verificou em estudos anteriores que existe uma boa correlação, comparando os resultados obtidos de CL_{50} para *Artemia salina* e os resultados de dose letal média (DL_{50}) para a toxicidade aguda em murganhos, o que aumenta a fiabilidade deste ensaio (Hamidi et al., 2014).

Este ensaio também tem vindo a ser cada vez mais utilizado, uma vez que apresenta inúmeras vantagens, como o facto de não ser muito dispendioso e é relativamente rápido e simples de realizar, pois não requer muitos equipamentos nem técnicas de assepsia. Para além disto, os náuplios têm um tamanho suficiente para conseguirem ser observados sem necessidade de uma grande ampliação, e pequenos o suficiente para que a eclosão dos ovos se dê em elevadas quantidades em laboratório, sem a necessidade de muito espaço (Alanís-Garza, González-González, Salazar-Aranda, Waksman de Torres, & Rivas-Galindo, 2007; Hamidi et al., 2014; Krishnaraju et al., 2005; Meyer et al., 1982; Sarah et al., 2017). No entanto, também é necessário que sejam rigorosamente cumpridas as condições experimentais ótimas para que se consigam obter resultados conclusivos, como a temperatura, pH do meio, salinidade e ar, assim como os controlos que são uma parte essencial do ensaio para que se possa verificar a sensibilidade dos náuplios e a conformidade com o procedimento padrão (Hamidi et al., 2014).

Para além da avaliação da toxicidade de extratos vegetais, este ensaio é utilizado para avaliar também a toxicidade de metais pesados e iões metálicos, algas e cianobactérias, materiais dentários, nanopartículas, rastreio de produtos marinhos naturais, assim como testar a qualidade de águas, deteção de toxinas fúngicas e também é uma ferramenta muito útil para o isolamento de compostos bioativos a partir de extratos vegetais (Hamidi et al., 2014; Karchesy et al., 2016; Krishnaraju et al., 2005).

O modelo de *Artemia salina* foi utilizado preliminarmente para avaliar a toxicidade de todos os extratos neste estudo. O DMSO foi testado a várias concentrações (1000; 100; 10; 1; 0,1 mg/L) para se perceber qual a concentração de extrato e de DMSO mais indicada a ser utilizada no ensaio, sendo que a concentração escolhida foi a de 10 mg/L, uma vez que é a concentração intermédia que não causa muita nem pouca % de mortes de náuplios de *Artemia salina* (Ntungwe et al., 2017). A solução salina serviu para perceber que os náuplios de *Artemia salina* não morrem devido ao sal, o que também não seria suposto, uma vez que este é o seu meio de crescimento, mas sim devido aos extratos em estudo, mas, no entanto, apesar de relativamente baixa, ainda se verificou alguma % de mortes de náuplios de *Artemia salina* (11,57%) neste mesmo meio.

Os resultados obtidos, apresentados na **Figura 27**, permitem concluir que o extrato de *P. hadiensis* foi o que apresentou a maior toxicidade dos cinco extratos testados (43,65%), seguido de *P. inflexus* que também é tóxico (38,70%) (Ntungwe et al., 2017).

Posteriormente, os dois únicos extratos considerados ativos foram novamente testados a uma gama de concentrações entre 0,01 e 1 mg/L, calculando-se a sua CL₅₀ após 24 horas, sendo que valores de CL₅₀ inferiores ou iguais a 1 mg/L foram considerados ativos. Concluiu-se novamente que o extrato mais tóxico foi o de *P. hadiensis*, com um valor de CL₅₀ de 0,880 mg/L (**Figura 28**) e o extrato de *P. inflexus* apresentou um valor de CL₅₀ de 0,986 mg/L (**Figura 29**) (Ntungwe et al., 2017, 2018).

Toxicidade Geral- letalidade em *Artemia salina*

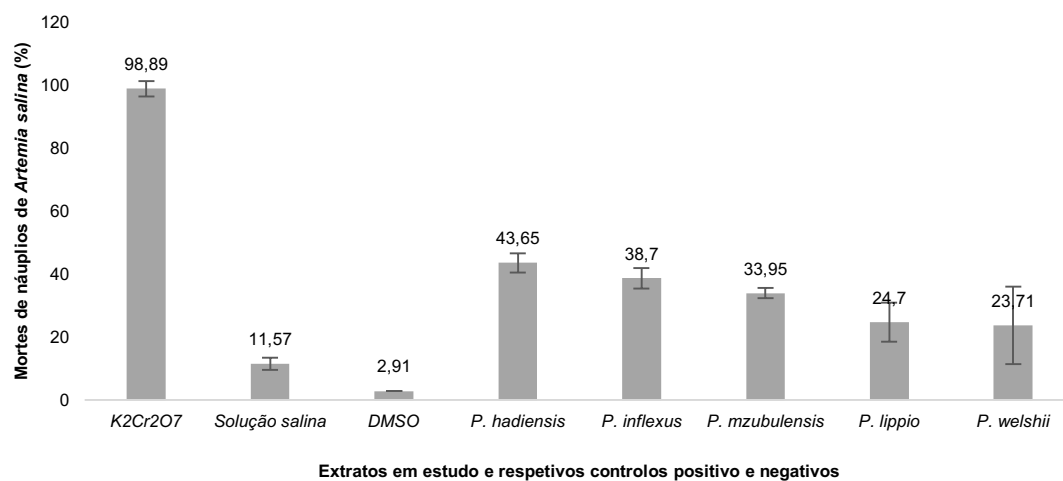


Figura 27- Resultados obtidos da pesquisa de atividade de cinco extratos de espécies de *Plectranthus* para toxicidade, à concentração de 10 mg/L, usando o ensaio de letalidade em *Artemia salina*.

CL₅₀ do extrato de *P. hadiensis*

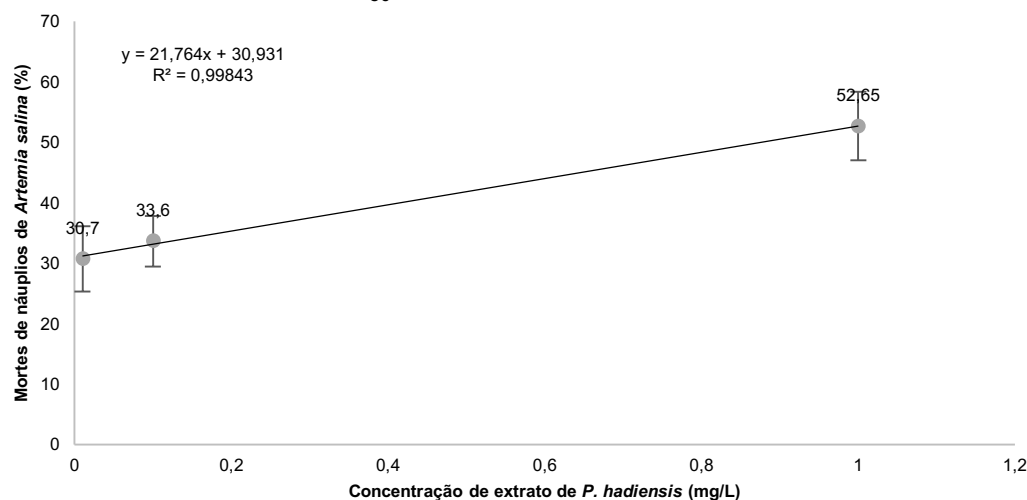


Figura 28- Resultado obtido para o valor de CL₅₀ para o extrato de *P. hadiensis* (0,880 mg/L), testado às concentrações de 0,01; 0,1 e 1 mg/L.

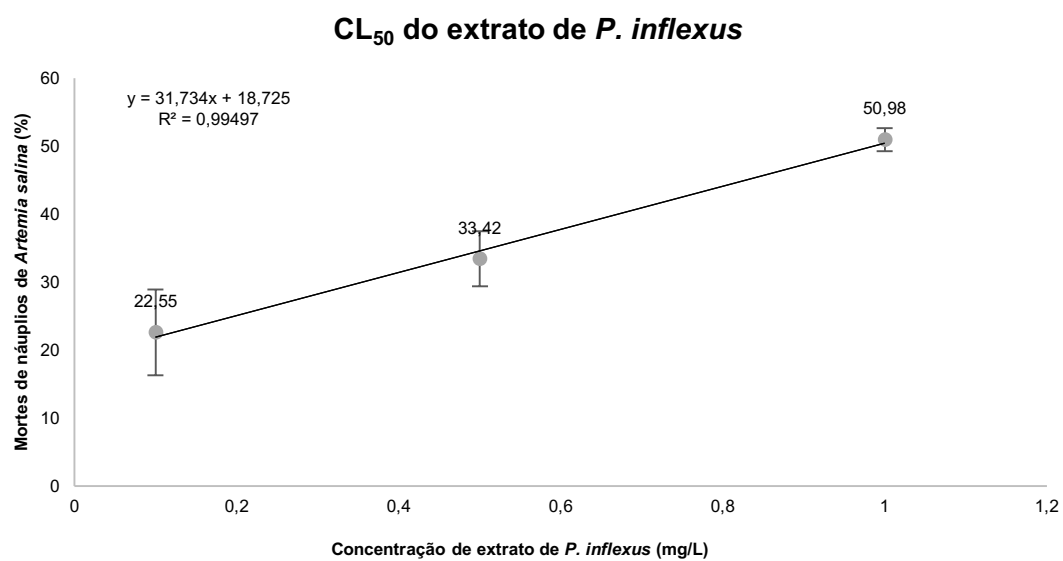


Figura 29- Resultado obtido para o valor de CL₅₀ para o extrato de *P. inflexus* (0,986 mg/L), testado às concentrações de 0,1; 0,5 e 1 mg/L.

2.5 Citotoxicidade

Existem vários fatores importantes que devem ser considerados ao escolher um ensaio de citotoxicidade, tais como, o tipo de células e de controlos utilizados, a dosagem das amostras e duração da exposição (Pasoski, 2009, p.26-27).

O ensaio de SRB é um ensaio colorimétrico utilizado para a determinação da densidade celular, com base na medição do teor de proteínas celulares, e é um dos métodos mais utilizados para o rastreio da citotoxicidade *in vitro*. Também é amplamente utilizado para testes de toxicidade de fármacos contra diferentes tipos de linhas celulares, sejam elas cancerígenas ou não cancerígenas. Este método não distingue entre células viáveis e mortas, mas, no entanto, não compromete a sua capacidade de detetar efeitos citotóxicos de um medicamento (Vichai & Kirtikara, 2006).

O SRB é um corante de cor rosa com dois grupos sulfónicos, que têm a capacidade de se ligar eletrostaticamente aos resíduos de aminoácidos das proteínas sob condições ácidas, e dissociam-se sob condições básicas. Este ensaio baseia-se então na capacidade do SRB se ligar a componentes proteicos de células, que foram fixadas a placas de cultura de tecidos pelo TCA. Como a ligação do SRB é estequiométrica, a quantidade de corante extraído das células coradas é diretamente proporcional à massa celular (Vichai & Kirtikara, 2006).

O método apresenta uma elevada sensibilidade porque tem a capacidade de detetar quantidades muito pequenas de células por poço, sendo o seu nível de sensibilidade comparável ao dos métodos de coloração fluorescentes, e superior ao de outros métodos de coloração de proteínas utilizando corantes visíveis convencionais (Vichai & Kirtikara, 2006).

A aplicação do ensaio de SRB limita-se ao rastreio manual ou semi-automático, devido aos múltiplos passos de lavagem e secagem, os quais ainda não são passíveis de automatização. No entanto, este método é bastante vantajoso ao permitir que um grande número de amostras seja testado em poucos dias e por requerer equipamentos e reagentes baratos, o que faz dele um ensaio eficiente e altamente custo-efetivo (Vichai & Kirtikara, 2006).

Devido aos resultados obtidos no ensaio de toxicidade geral em modelo de *Artemia salina*, onde o extrato de *P. hadiensis* revelou ser o mais tóxico, realizou-se posteriormente para este extrato um ensaio de citotoxicidade, ou seja, estudou-se o seu efeito no crescimento de linhas celulares tumorais humanas de carcinoma colorretal (HCT116), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e carcinoma de pulmão (NCI-H460) (Ntungwe et al., 2018).

Este ensaio foi realizado em parceria com o LAQV/REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob coordenação da Professora Doutora Lucília Saraiva.

A concentração que induz 50% de inibição do crescimento celular pelo extrato, CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$), foi determinada pelo ensaio de SRB após 48 horas de tratamento. Comparando com os respetivos controlos positivos, o extrato de *P. hadiensis* não apresentou uma citotoxicidade superior a nenhum deles para todas as linhas celulares, logo não é mais citotóxico que os fármacos de referência utilizados (doxorrubicina e paclitaxel), visto que todos os valores de CI_{50} do extrato são superiores aos valores de CI_{50} dos controlos positivos. Na linha celular HCT116, *P. hadiensis* apresentou um valor de CI_{50} de $3,45 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$, e nas linhas celulares MCF-7 e NCI-H460, $2,90 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ e $3,00 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$, respetivamente (**Tabela 4**). A partir destes resultados foi possível concluir que, comparando com os valores dos controlos positivos, o extrato de *P. hadiensis* apresenta uma citotoxicidade significativa para todas as linhas celulares tumorais. Em estudos anteriormente realizados, já tinha sido relatado que *P. hadiensis* apresenta citotoxicidade em células humanas de cancro do cólon (Menon & Gopalakrishnan, 2015), o que também se confirma a partir dos resultados obtidos neste ensaio. Observando os resultados obtidos para todas as linhas celulares, a maior citotoxicidade apresentada é para a linha celular de adenocarcinoma de mama (MCF-7), uma vez que é a que apresenta o menor valor de CI_{50} ($2,90 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$), e como tal também este valor é o que está mais próximo do valor do seu respetivo controlo positivo doxorrubicina ($0.16 \pm 0.0018 \mu\text{g/mL}$). De acordo com os resultados revelados pelo extrato de *P. hadiensis*, nos ensaios realizados de toxicidade geral e de citotoxicidade, podemos concluir que o mesmo revela uma toxicidade significativa. Estes resultados poderão então explicar consequentemente, a atividade antimicrobiana exibida pelo extrato nos ensaios do método de difusão em poços e de microdiluição (Ntungwe et al., 2018).

Alguns dos compostos presentes nas plantas do género *Plectranthus*, principalmente os diterpenos do tipo abietano, são estudados há muito tempo devido ao seu potencial antitumoral, citotóxico e antiproliferativo (Amin et al., 2009; Cragg & Newman, 2005; Demain & Vaishnav, 2011; Garcia et al., 2018; Podolski-Renic' et al., 2011).

Apesar de existirem poucos estudos, e de ser necessário que sejam realizados ainda mais, de modo a se conseguir compreender quais os mecanismos de ação e alvos celulares dos diterpenos abietanos, pensa-se que estes possam ser os responsáveis pela citotoxicidade apresentada pelos extratos de plantas do género *Plectranthus*, devido ao facto de serem capazes de induzir a morte celular através de mecanismos apoptóticos, principalmente

através da via intrínseca (Garcia et al., 2018). O seu mecanismo de ação é visto principalmente através da libertação do citocromo c da mitocôndria para o citosol, acompanhado pela ativação da caspase efetora 3, e um nível reduzido da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Akaberi et al., 2014; Burmistrova et al., 2015; Garcia et al., 2018).

Tabela 4- Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do extrato acetónico de *P. hadiensis* em linhas celulares HCT116, MCF-7 e NCI-H460. **a:** controlo positivo doxorrubicina; **b:** controlo positivo paclitaxel; *(Matias et al., 2019).

	HCT116^a	MCF-7^a	NCI-H460^b
Controlo positivo	0.125 $\pm$ 0.0013*	0.16 $\pm$ 0.0018*	0.0006 $\pm$ 0.0001*
<i>P. hadiensis</i>	3.45 $\pm$ 0.35	2.90 $\pm$ 0.10	3.00 $\pm$ 0.10

2.6 Ensaio de inibição da AChE *in vitro*

O ensaio de Ellman é um método colorimétrico qualitativo, frequentemente usado para determinar a atividade da AChE, e que avalia a capacidade do 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) de quantificar compostos contendo grupos com enxofre nos tecidos celulares. Este ensaio é baseado na taxa de hidrólise da acetiltiocolina (ACTI) pela AChE, dando origem à tiocolina que reage com o anião carboxilato do DTNB, formando o 2-nitrobenzoato-5-mercaptopiocolina, e um anião de coloração amarela, o 5-tio-2-nitrobenzoato, que é posteriormente quantificado espectralmente (Figura 30). A reação enzimática produz uma cor amarela de fundo para os compostos inibidores e zonas brancas onde a cor não se desenvolveu (Araújo et al., 2016; Ellman, 1959; Ellman, Courtney, Andres, & Featherstone, 1961).

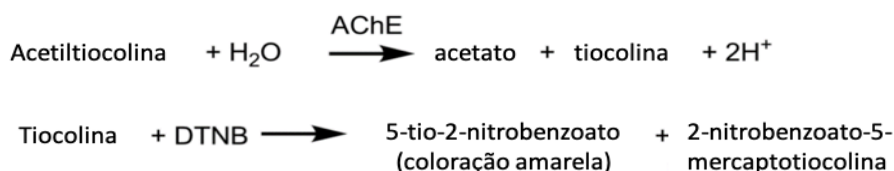


Figura 30- Reação química da detecção da atividade da AChE pelo método de Ellman (Rijo, 2010, p.155).

Atualmente é extensivamente utilizado para determinar a atividade inibitória da AChE, de compostos tanto de origem natural como sintética. As vantagens e as razões do uso frequente desta metodologia estão relacionadas com o facto de ser prático, e de possuir elevada sensibilidade e reprodutibilidade (Araújo et al., 2016).

Neste estudo, o ensaio de inibição da AChE *in vitro* foi realizado apenas para o extrato mais bioativo, o extrato acetónico de *P. hadiensis*, utilizando-se o ensaio de Ellman. Os resultados obtidos, representados na Figura 31, permitiram verificar que o extrato de *P. hadiensis* mostrou uma inibição moderada da AChE (19,98%), quando comparado com o controlo positivo tacrina (94,45%) (Ntungwe et al., 2017).

Em estudos anteriores realizados em extratos de *Plectranthus*, verificou-se que o alto teor de ácido rosmarínico foi associado a uma alta inibição da AChE, assim como a uma elevada atividade antioxidante, o que para este extrato não se verifica, e como tal, pode-se deduzir que o teor de ácido rosmarínico do mesmo deve ser baixo. Conclui-se então que este extrato não será o melhor ponto de partida para a pesquisa de fármacos que inibam o stress oxidativo, envelhecimento e para a terapêutica de demências como a DA (Alanís-Garza et al., 2007; Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2014).

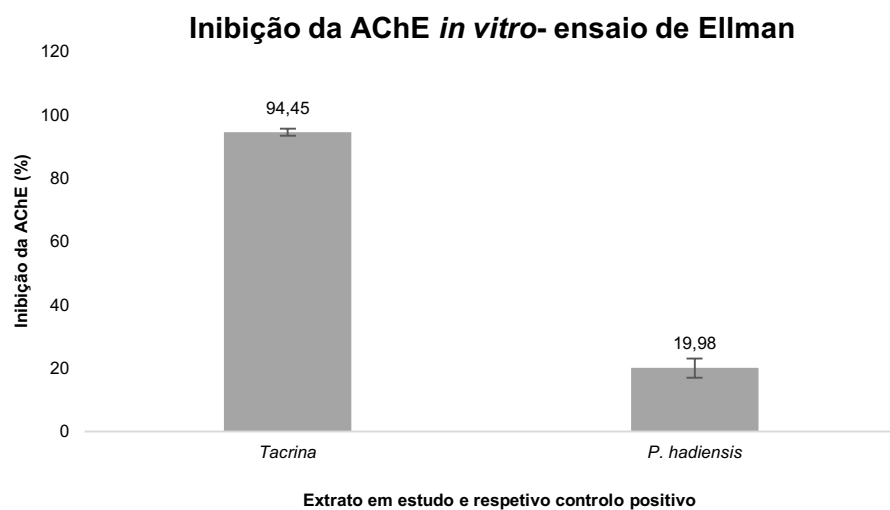


Figura 31- Resultados obtidos para a percentagem de inibição da AChE para o extrato de *P. hadiensis*.

2.7 Estudo fitoquímico do extrato bioativo de *P. hadiensis*

Através dos resultados obtidos em todos os ensaios anteriormente realizados, percebeu-se então que o extrato de *P. hadiensis* é um ponto de partida interessante para futuros estudos fitoquímicos adicionais, de modo a se poder identificar outras potenciais bioatividades e quais os compostos que são responsáveis pelas atividades biológicas reveladas (Ntungwe et al., 2017).

Desta forma, procedeu-se posteriormente ao fracionamento e isolamento do(s) composto(s) bioativo(s) do extrato de *P. hadiensis*, sendo que se realizaram ao todo nesta atividade experimental, 2 fracionamentos, utilizando a técnica de CCFP.

Esta técnica é um método analítico qualitativo, utilizado para a purificação de pequenas quantidades de amostra, e uma vez que permite a separação rápida de vários componentes de uma mistura de reação, é especialmente útil para obter um perfil dos componentes de extratos naturais. É um método também bastante vantajoso, uma vez que é simples de executar e por ser fácil de controlar a eficiência de separação logo nas etapas iniciais (Bele & Khale, 2011; Ritter & Meyer, 1962).

O primeiro fracionamento serviu como um fracionamento preliminar em pequena escala, para ensaios biológicos, de modo a se conseguir selecionar a fração mais bioativa. Antes de se iniciar a CCFP foram realizadas primeiramente duas CCF, obtendo-se três frações A, B e C por ordem crescente de polaridade, e por fim procedeu-se à sua visualização à luz visível e fez-se a respetiva revelação a 254 e 366 nm (**Figura 32**).

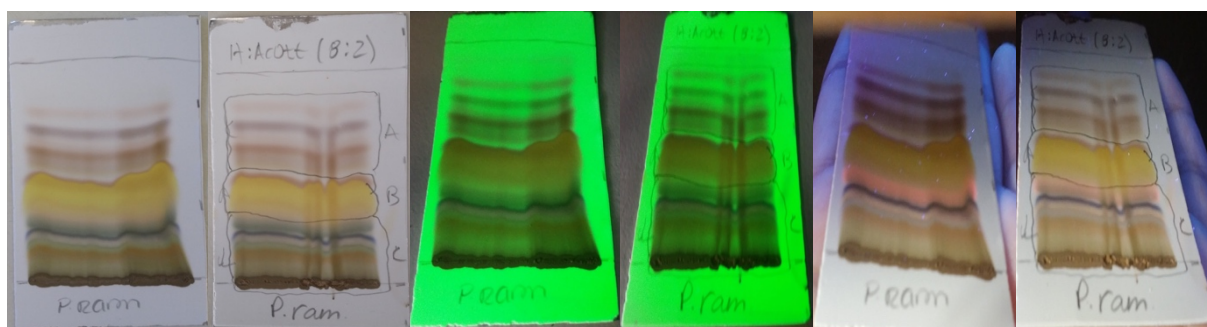


Figura 32- Placas de CCF após eluição e antes do fracionamento, visualizadas à luz visível e respetiva revelação a 254 e 366 nm (captado em 05/04/2017).

Da realização da CCFP foram obtidas as mesmas 3 frações A, B e C, e de seguida, fez-se a sua desadsorção da sílica, registando-se a massa de cada fração apresentada na **Tabela 5**. Por fim realizou-se uma CCF para as três frações A, B e C e posteriormente procedeu-se à sua visualização à luz visível e respetiva revelação a 254 e 366 nm (**Figura 33**) e também com uma mistura de H₂SO₄/MeOH aos mesmo comprimentos de onda (**Figura 34**).

Tabela 5- Massas finais das frações A, B e C resultantes do processo de CCFP.

Fração	Massa (g)
A	0,015
B	0,065
C	0,071

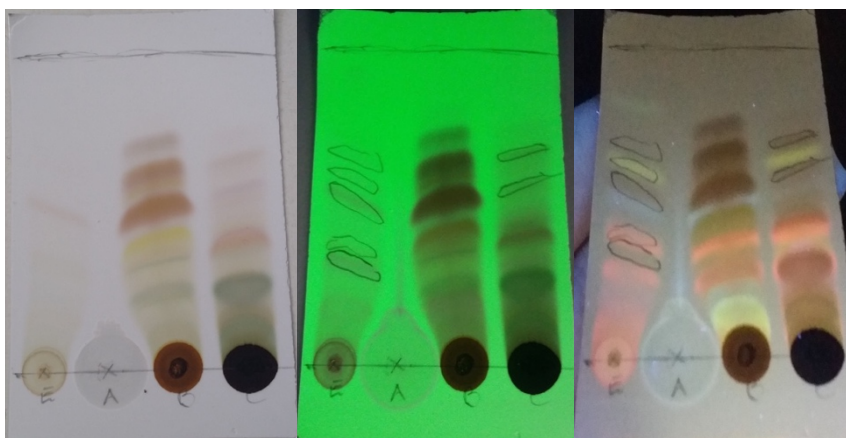


Figura 33- Placa de CCF para as três frações A, B e C, após o fracionamento e após eluição visualizada à luz visível, e respetiva revelação a 254 nm e 366 nm (captado em 05/04/2017).

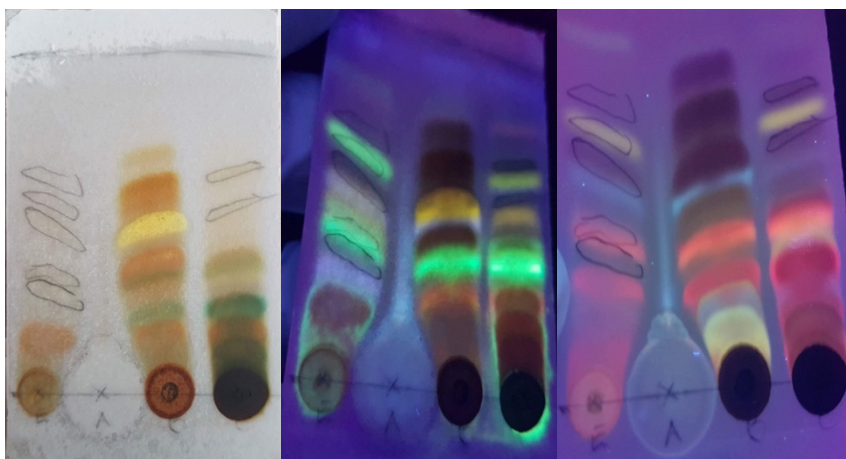


Figura 34- Placa de CCF para as três frações A, B e C, após o fracionamento e após eluição visualizada à luz visível, e respetiva revelação com H₂SO₄/MeOH a 254 nm e 366 nm (captado em 05/04/2017).

Finalmente, a atividade antimicrobiana de cada uma das 3 frações A, B e C, anteriormente obtidas, foi testada contra duas estirpes de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *E. faecalis*), duas estirpes de bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) e duas estirpes de leveduras (*S. cerevisiae* e *C. albicans*). O método utilizado foi o método de difusão em poços, que permitiu concluir que nenhuma das frações A, B e C assim como o extrato, apresentam atividade antimicrobiana contra ambas as leveduras, tal como para a bactéria Gram-negativa *E. coli*, uma vez que todos apresentam diâmetros de halos de inibição iguais ou inferiores aos dos controlos negativos (**Figura 35**). Relativamente à bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*, todas as frações assim como o extrato, apresentam uma atividade antimicrobiana muito pouco significativa ou quase inexistente (**Figura 35**). Por outro lado, todas as frações e o extrato apresentam atividade antimicrobiana significativa contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* e moderada contra a bactéria Gram-positiva *E. faecalis* (**Figura 35**), como já verificado anteriormente em estudos realizados em outras espécies de *Plectranthus*. É importante referir que, apesar de todas as frações possuírem atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, a fração B, que é a que possui os compostos de polaridade intermédia, é aquela que apresenta maior atividade. Comparando com os halos de inibição apresentados pelo extrato de *P. hadiensis*, esta fração apresenta um halo de inibição para *E. faecalis* superior (21 mm) e para *S. aureus* apresenta um halo de inibição igual (25 mm), e como tal, a fração B apresenta atividade antimicrobiana igual ou superior ao extrato para bactérias Gram-positivas. Isto poderá significar que eventualmente, após o fracionamento, os compostos com atividade antimicrobiana estão mais concentrados na fração B, visto que é a mais ativa, ou então poderão existir compostos nesta mesma fração com uma atividade antimicrobiana superior à do próprio extrato.

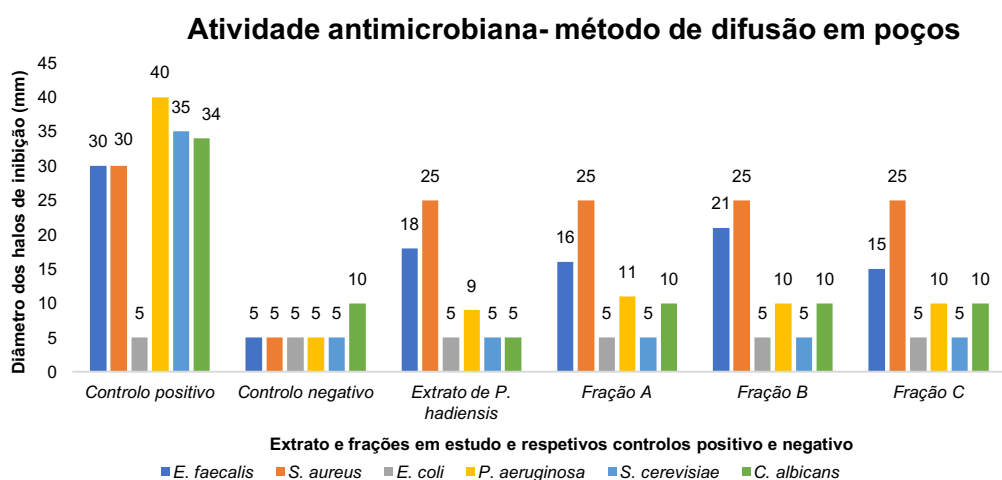


Figura 35- Resultados obtidos para a atividade antimicrobiana do extrato de *P. hadiensis* e das frações A, B e C em estudo.

Tal como já tinha sido referido anteriormente, e devido aos resultados obtidos nas diferentes atividades biológicas testadas, *P. hadiensis* é então um candidato promissor ao isolamento dos seus compostos bioativos, sua elucidação estrutural através de métodos espectroscópicos e confirmar a bioatividade desses mesmos compostos responsáveis pela atividade biológica revelada (Ntungwe et al., 2017).

Para tal, realizou-se o segundo fracionamento com o objetivo de isolar e identificar o(s) composto(s) bioativo(s) do extrato de *P. hadiensis*, e desta forma, descobrir qual ou quais poderão ser os compostos responsáveis pela bioatividade deste mesmo extrato.

Da realização de uma nova CCFP, foram obtidas quatro frações com interesse, sendo estas F1, F2, F3 e F4, também por ordem crescente de polaridade, escolhendo-se as que apresentaram um comportamento semelhante ao das roileanonas, porque mudam de cor consoante o pH do meio em que se encontram, sendo que em meio ácido apresentam uma coloração arroxeada, mas com a mudança de pH mudam para uma tonalidade amarelada, sendo que este comportamento se verifica nas duas primeiras frações F1 e F2 (**Figura 36**).

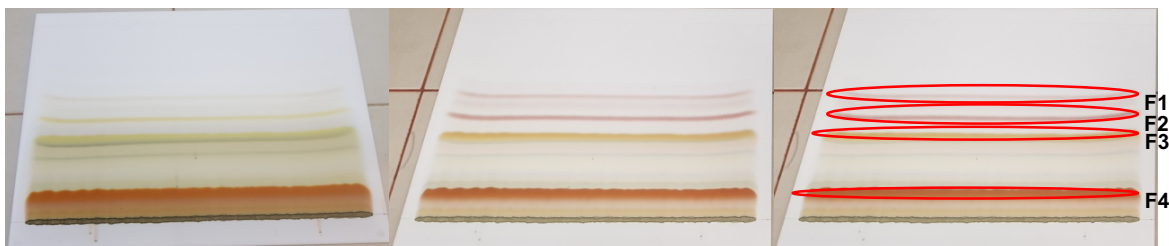


Figura 36- Observação da mudança de coloração e seleção das frações 1, 2, 3 e 4 (F1, F2, F3 e F4) com interesse a separar (captado em 16/02/2018).

As quatro frações foram posteriormente desadsorvidas da sílica (**Figura 37**), registando-se a massa de cada fração, apresentada na **Tabela 6**.

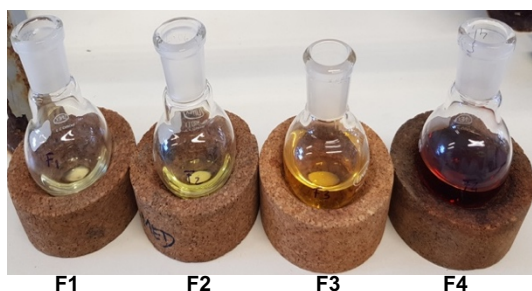


Figura 37- Aspeto final das frações F1, F2, F3 e F4 após o processo de desadsorção da sílica (captado em 16/02/2018).

Tabela 6- Massas finais das frações F1, F2, F3 e F4 resultantes do processo de CCFP.

Fração	Massa (g)
F1	0,005
F2	0,008
F3	0,008
F4	0,013

Por fim, através da realização de uma CCF com as 4 frações F1, F2, F3 e F4, foi possível concluir que existia uma fração pura, a fração F2, uma vez que esta apresentava apenas uma mancha (**Figura 38**).

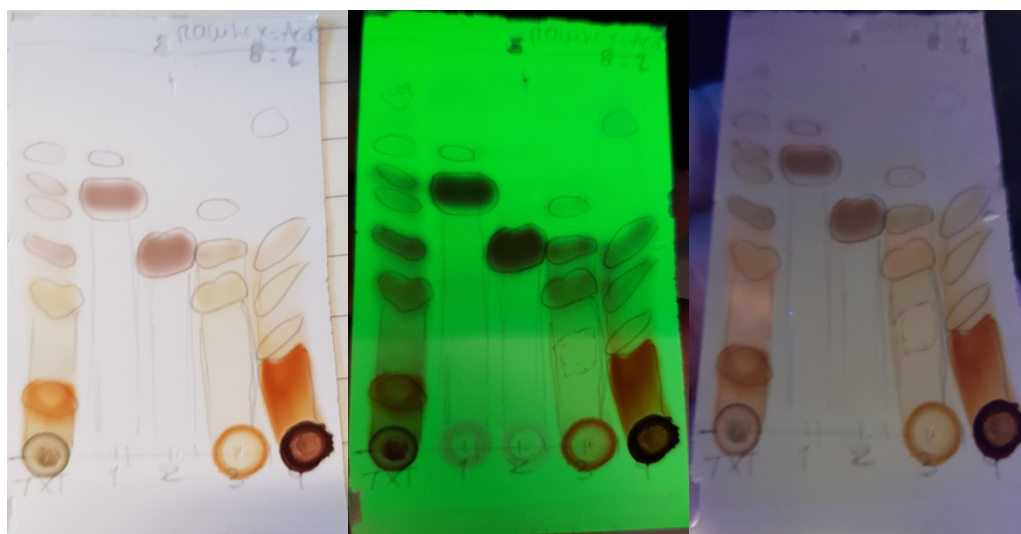


Figura 38- Placa de CCF para as quatro frações F1, F2, F3 e F4, após eluição visualizada à luz visível, e a 254 nm e 366 nm, respetivamente (captado em 20/02/2018).

Para a identificação estrutural do(s) composto(s) presente(s) na fração F2, fez-se o seu estudo recorrendo-se a métodos espectroscópicos, ou seja, utilizou-se a técnica de RMN, que revelou a presença do protão H-15 (septeto) característico do esqueleto de abietano, como se pode observar na **Figura 39**.

O diterpeno abietano isolado era do tipo roileanona, sendo este, 7α -acetoxi- 6β -hidroxiroileanona, o que coincide com a informação presente em estudos anteriores que apontavam que este diterpeno abietano poderia ser encontrado na espécie de *P. hadiensis* (Ladeiras et al., 2016). Este composto poderá ser então o responsável pela atividade biológica, mas no entanto, outros compostos ou o seu efeito sinérgico poderão explicar, por exemplo, a citotoxicidade do extrato (Ntungwe et al., 2018).

Anteriormente, esta roileanona tinha sido isolada de *Plectranthus gradidentatus* e exibiu atividade antimicrobiana significativa contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *E. faecalis*, o que está de acordo com os resultados obtidos na atividade antimicrobiana contra *S. aureus* observada no extrato de *P. hadiensis*, que foi bastante significativa, mas por outro

lado, o extrato estudado não apresentou atividade muito significativa contra *E. faecalis*, sendo que isto pode sugerir que o composto isolado possui uma atividade mais forte do que o próprio extrato (Ntungwe et al., 2018; Rijo et al., 2013b).

Também em estudos anteriores, foi relatado que 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona possui uma elevada capacidade antiproliferativa (Cerqueira et al., 2004; Ntungwe et al., 2018), e é um agente redutor fraco no ensaio com DPPH (Ntungwe et al., 2018; Rosa et al., 2015), o que poderá explicar o resultado obtido para o ensaio da atividade antioxidante do extrato de *P. hadiensis*, que apesar de possuir alguma atividade, esta era moderada comparativamente com o controlo positivo.

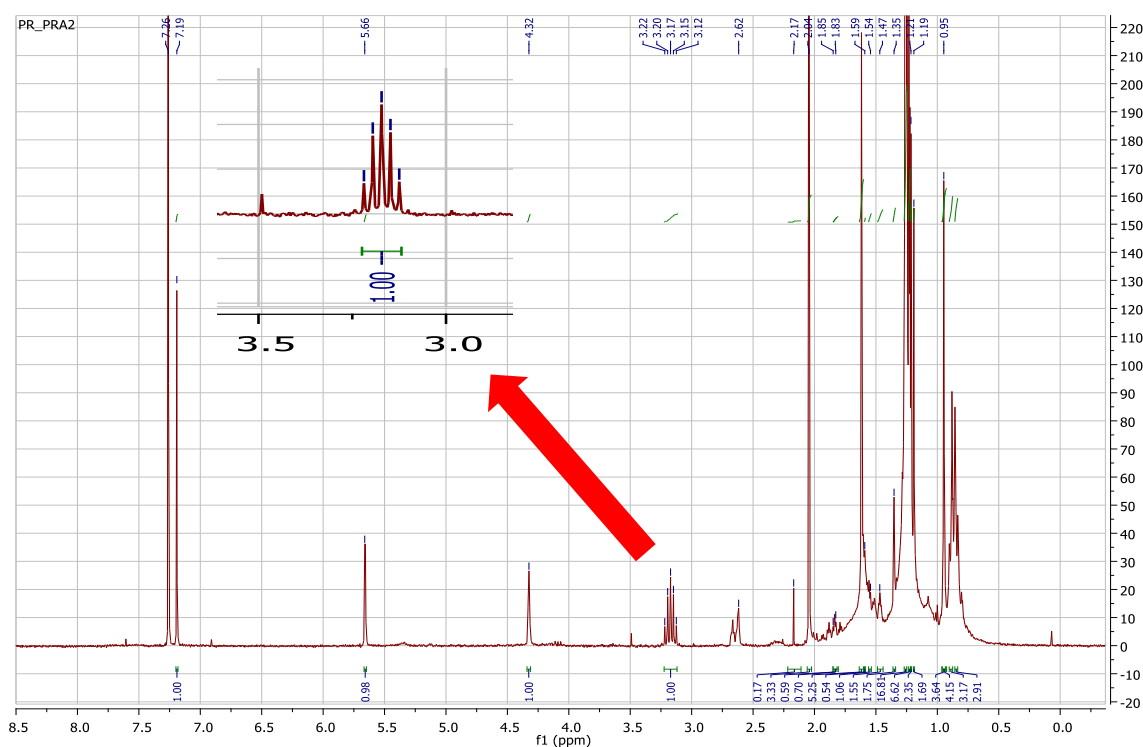


Figura 39- Espetro de ¹H-RMN para o composto presente na fração F2, onde é possível identificar a presença de um diterpeno abietano (Ntungwe et al., 2018).

Conclusão

As plantas do género *Plectranthus* são conhecidas por possuírem atividade biológica reportada, como antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e anti-malária, entre outras. Deste modo, estas plantas são utilizadas na medicina tradicional em África, na Ásia e na Austrália, no tratamento das mais variadas patologias e afeções. São também uma importante fonte de diterpenóides do tipo abietano, que são os potenciais compostos responsáveis pela atividade biológica apresentada por estas plantas.

No presente trabalho, foram estudadas cinco espécies de *Plectranthus* (*P. hadiensis*, *P. inflexus*, *P. lippio*, *P. welshii* e *P. mzubulensis*) para avaliação da sua atividade biológica. Assim, foi determinado o rendimento de extração através do método de ultrassons, a avaliação da atividade antioxidante (testes qualitativo e quantitativo) através do método de DPPH, a atividade antimicrobiana usando o método de difusão em poços, e toxicidade geral usando como modelo a *Artemia salina*. Posteriormente, e de acordo com os resultados promissores obtidos nestes ensaios preliminares da atividade biológica, foi selecionada a espécie de *P. hadiensis*, onde se realizou a avaliação de inibição da AChE *in vitro*, segundo o ensaio de Ellman e a avaliação da atividade antimicrobiana, através do método de microdiluição, onde foram determinados os valores de CMI, CMB e CMF. A atividade citotóxica foi também avaliada recorrendo-se ao ensaio de SRB, sendo que este foi realizado em parceria com o LAQV/REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob coordenação da Professora Doutora Lucília Saraiva.

O extrato acetónico de *P. hadiensis* foi o mais promissor em relação às atividades biológicas estudadas, uma vez que foi o que obteve o maior rendimento de extração (13,49% m/m) e foi o único que obteve efeito sobre a inibição do crescimento contra bactérias Gram-positivas e leveduras em estudo, para o método de difusão em poços (zonas de inibição contra *S. aureus* - 15 mm e *C. albicans* -11 mm) e para o método de microdiluição (valores de CMI para *S. aureus*, *S. aureus*-CIP106760 e *C. albicans* de 15,62 µg/mL, 3,91 µg/mL e 62,5 µg/mL, respetivamente, e valor de CMF para *C. albicans* de 62,5 µg/mL). Este extrato promissor demonstrou inibição da AChE (19,98%) e uma atividade antioxidante (36,24%) moderadas e revelou uma elevada toxicidade geral (CL_{50} = 0,880 mg/L). No ensaio de citotoxicidade, o extrato de *P. hadiensis* revelou uma citotoxicidade significativa em linhas celulares tumorais humanas de carcinoma colorretal (HCT116= 3,45 ± 0,35 µg/mL), adenocarcinoma de mama (MCF-7= 2,90 ± 0,10 µg/mL) e carcinoma de pulmão (NCI-H460= 3,00 ± 0,10 µg/mL).

O extrato de *P. hadiensis* revelou ser o mais bioativo, devido à elevada atividade biológica demonstrada nos diferentes ensaios realizados. Deste modo, foi selecionado para o

isolamento cromatográfico e identificação espectroscópica do diterpeno abietano do tipo roileanona, 7 α -acetoxi-6 β -hidroxiroileanona. Este composto é o potencial responsável pela bioatividade demonstrada pelo extrato.

Em trabalhos futuros, seria interessante usar este composto como molécula protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos.

Bibliografia

Abdel-Mogib, M., Albar, H. A., & Batterjee, S. M. (2002). Chemistry of the Genus *Plectranthus*. *Molecules*, 7, 271–301.

Abdissa, N., Frese, M., & Sewald, N. (2017). Antimicrobial Abietane-Type Diterpenoids from *Plectranthus punctatus*. *Molecules*, 22, 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules22111919>

Ahmad, V. U., Khan, A., Farooq, U., Kousar, F., Khan, S. S., Nawaz, S. A., et al., (2005). Three new cholinesterase-Inhibiting *cis*-clerodane diterpenoids from *Otostegia limbata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 53(4), 378–381.

Akaberi, M., Mehri, S., & Iranshahi, M. (2014). Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from *Salvia* species. *Fitoterapia*, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2014.11.008>

Alanís-Garza, B. A., González-González, G. M., Salazar-Aranda, R., Waksman de Torres, N., & Rivas-Galindo, V. M. (2007). Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(3), 468–471. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.026>

Alvarenga, S. A. V., Gastmans, J. P., Rodrigues, G. do V., Moreno, P. R. H., & Emerenciano, V. de P. (2001). A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies - diterpenes in Lamiaceae. *Phytochemistry*, 56(6), 583–595. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00424-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00424-6)

Amin, A., Gali-Muhtasib, H., Ocker, M., & Schneider-Stock, R. (2009). Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs. *International Journal of Biomedical Science*, 5(1), 1–11.

Andrade-Cetto, A., Becerra-Jiménez, J., & Cárdenas-Vázquez, R. (2008). Alfa-glucosidase-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.10.031>

Andrade, J. M., Custódio, L., Romagnoli, A., Reis, C. P., Rodrigues, M. J., Garcia, C., et al., (2018). Antitubercular and anti-inflammatory properties screening of natural products from *Plectranthus* species. *Future Medicinal Chemistry*, 10(14), 1677–1691. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0043>

Araújo, C. R. M. A., Santos, V. L. dos A., & Gonsalves, A. A. (2016). Acetilcolinesterase - AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. *Revista Virtual de Química*, XX(XX). <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160122>

Arikan, S. (2007). Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Medical Mycology*, (November), 45, 569–587. <https://doi.org/10.1080/13693780701436794>

Attanayake, A. P., & Jayatilaka, K. A. P. W. (2016). Evaluation of antioxidant properties of 20 medicinal plant extracts traditionally used in Ayurvedic medicine in Sri Lanka. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 15(1), 50–56. <https://doi.org/10.1017/S095457941700030X>

Baghel, S. S., Shrivastava, N., Baghel, R. S., Agrawal, P., & Rajput, S. (2012). A Review of Quercetin: Antioxidant and Anticancer Properties. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 146–160.

Balachandra, B. A. H. E., Pathirathna, P. U., & Paranagama, P. A. (2012). Control of stored grain pest, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) using the essential oil isolated from *Plectranthus zeylanicus*. *Natural Product Research*, 26(23), 2219–2222. <https://doi.org/10.1080/14786419.2011.643883>

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>

Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, 78(5), 431–441. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.09.012>

Bele, A. A., & Khale, A. (2011). AN OVERVIEW ON THIN LAYER CHROMATOGRAPHY. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(2), 256–267.

Bona, E. A. M. De, Pinto, F. G. da S., Fruet, T. K., Jorge, T. C. M., & Moura, A. C. de. (2014). Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arq. Inst. Biol.*, 81(3), 218–225. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001192012>

Bonomini, F., Rodella, L. F., & Rezzani, R. (2015). Metabolic Syndrome, Aging and Involvement of Oxidative Stress. *Aging and Disease*, 6(2), 109–120. <https://doi.org/10.14336/AD.2014.0305>

Bueno, A. C., & Piovezan, M. (1982). Bioensaio toxicológico utilizando *Artemia salina*: fatores envolvidos em sua eficácia. *Instituto Federal de Santa Catarina*, 1–6.

Burmistrova, O., Perdomo, J., Simões, M. F., Rijo, P., Quintana, J., & Estévez, F. (2015). The abietane diterpenoid Parvifloron D from *Plectranthus ecklonii* is a potent apoptotic inducer in human leukemia cells. *International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.06.013>

Butler, M. S. (2004). The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*, 67(12), 2141–2153. <https://doi.org/10.1021/np040106y>

Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74(17), 2157–2184. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.047>

Cerqueira, F., Cordeiro-Da-Silva, A., Gaspar-Marques, C., Simões, F., Pinto, M. M. M., & Nascimento, M. S. J. (2004). Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on T- and B-lymphocyte proliferation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(1), 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.10.006>

Chen, C.-C., Wang, J.-K., Chen, W.-C., & Lin, S.-B. (1998). Protein Kinase C η Mediates Lipopolysaccharide-induced Nitric-oxide Synthase Expression in Primary Astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(31), 19424–19430. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19424>

Chen, X., Guo, C., & Kong, J. (2012). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Neural Regeneration Research*, 7(5), 376–385. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-5374.2012.05.009>

Clinical & Laboratory Standards Institute. (2003). *Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada* (8ª ed.) Anvisa (vol. 23). https://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf

Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M., & Vasic, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11(3), 315–335. <https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006>

Cordell, G. A. (2000). Biodiversity and drug discovery- a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, 55(6), 463–480. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00230-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00230-2)

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2), 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.011>

Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2010). Influence of some experimental variables and matrix components in the determination of antioxidant properties by β -carotene bleaching assay: experiments with BHT used as standard antioxidant. *European Food Research and Technology*, 231(6), 835–840. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1333-4>

Dawidowicz, A. L., & Olszowy, M. (2011). Antioxidant properties of BHT estimated by ABTS assay in systems differing in pH or metal ion or water concentration. *European Food Research and Technology*, 232(5), 837–842. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1451-7>

Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology*, 4(6), 687–699. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2010.00221.x>

Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97(4), 654–660. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.04.028>

Duracková, Z. (2010). Some Current Insights into Oxidative Stress. *Physiological Research*, 59(4), 459–469.

Ellman, G. L. (1959). Tissue Sulfhydryl Groups. *ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS*, 82, 70–77.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

Falé, P. L., Borges, C., Madeira, P. J. A., Ascensão, L., Araújo, M. E. M., Florêncio, M. H., et al., (2009). Rosmarinic acid, scutellarein 4'-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* ("falso boldo"). *Food Chemistry*, 114(3), 798–805. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.015>

Felipe, L. O., & Bicas, J. L. (2017). Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química e Sociedade*, 39(2), 120–130. <https://doi.org/10.21577/0104-8899.20160068>

Gali-Muhtasib, H., Hmadi, R., Kareh, M., Tohme, R., & Darwiche, N. (2015). Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. *Apoptosis*, 20(12), 1531–1562. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1169-2>

Garcia, C., Teodósio, C., Oliveira, C., Oliveira, C., Díaz-lanza, A., Reis, C., et al., (2018). Naturally Occurring *Plectranthus*-derived Diterpenes with Antitumoral Activities. *Current Pharmaceutical Design*, 24(36), 4207-4236(30). <https://doi.org/10.2174/1381612825666190115144241>

Gaspar-Marques, C., Rijo, P., Simões, M. F., Duarte, M. A., & Rodriguez, B. (2006). Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *Phytomedicine*, 13(4), 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.06.002>

Gaspar-Marques, C., Simões, M. F., Valdeira, M. L., & Rodríguez, B. (2008). Terpenoids and phenolics from *Plectranthus strigosus*, bioactivity screening. *Natural Product Research*, 22(2), 167–177. <https://doi.org/10.1080/14786410701654560>

Gibbons, S. (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*, 21(2), 263–277. <https://doi.org/10.1039/b212695h>

Gibbons, S. (2008). Phytochemicals for Bacterial Resistance - Strengths, Weaknesses and Opportunities. *Planta Medica*, 74(6), 594–602. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1074518>

Grayer, R. J., Eckert, M. R., Lever, A., Veitch, N. C., Kite, G. C., & Paton, A. J. (2010). Distribution of exudate flavonoids in the genus *Plectranthus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38, 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.01.014>

Greenwell, M., & Rahman, P. K. S. M. (2015). Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *International Journal of Pharmaceutical Science Research*, 6(10), 4103–4112. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(10\).4103-12](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4103-12). Medicinal

Guimarães, D. O., Momesso, L. da S., & Pupo, M. T. (2010). ANTIBIÓTICOS: IMPORTÂNCIA TERAPÊUTICA E PERSPECTIVAS PARA A DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES. *Química Nova*, 33(3), 667–679. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>

Hamidi, M. R., Jovanova, B., & Panovska, T. K. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. *Macedonian pharmaceutical bulletin*, 60(1), 9–18.

Hanson, J. R. (2009). Diterpenoids. *Natural Product Reports*, 26(9), 1156–1171. <https://doi.org/10.1039/b807311m>

Hocayen, P. de A. S., Campos, L. A., Pochapski, M. T., & Malfatti, C. R. M. (2012). Avaliação da Toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. *INSULA Revista de Botânica*, (41), 23–31. <https://doi.org/10.5007/2178-4574.2012n41p23>

Hong, S. S., Lee, S. A., Han, X. H., Jin, H. Z., Lee, J. H., Lee, D., et al., (2007). Kaurane Diterpenoids from *Isodon excisus* Inhibit LPS-Induced NF- κ B Activation and NO Production in Macrophage RAW264.7 Cells. *Journal of Natural Products*, 70(4), 632–636. <https://doi.org/10.1021/np060638+>

Hussein, A. A. (2018). Chemistry of South African Lamiaceae. Part-I: Structures and Biological Activity of Terpenoids. *Terpenes and Terpenoids*, 1–28.

Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Medical Microbiology*, 49, 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>

Kabouche, A., Kabouche, Z., Öztürk, M., Kolak, U., & Topçu, G. (2007). Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. *Food Chemistry*, 102(4), 1281–1287. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.021>

Karchesy, Y. M., Kelsey, R. G., Constantine, G., & Karchesy, J. J. (2016). Biological screening of selected Pacific Northwest forest plants using the brine shrimp (*Artemia salina*) toxicity bioassay. *SpringerPlus*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2145-1>

Kitaoka, N., Lu, X., Yang, B., & Peters, R. J. (2015). The Application of Synthetic Biology to Elucidation of Plant Mono-, Sesqui-, and Diterpenoid Metabolism. *Molecular Plant*, 8(1), 6–16. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.12.002>

Ko, H. M., Koppula, S., Kim, B.-W., Kim, I. S., Hwang, B. Y., Suk, K., et al., (2010). Inflexin attenuates proinflammatory responses and nuclear factor-KB activation in LPS-treated microglia. *European Journal of Pharmacology*, 633(1–3), 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.02.011>

Krishnaraju, A. V., Rao, T. V. N., Sundararaju, D., Vanisree, M., Tsay, H.-S., & Subbaraju, G. V. (2005). Assessment of Bioactivity of Indian Medicinal Plants Using Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 3(2), 125–134.

Kubínová, R., Pořízková, R., Navrátilová, A., Farsa, O., Hanáková, Z., Bačinská, A., et al., (2014). Antimicrobial and enzyme inhibitory activities of the constituents of *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(5), 749–752. <https://doi.org/10.3109/14756366.2013.848204>

Kuete, V. (2017). *Medicinal Spices and Vegetables from Africa: Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases* (1^a ed.). Amsterdam: Academic Press.

Ladeiras, D., Monteiro, C. M., Pereira, F., Reis, C. P., Afonso, C. A. M., & Rijo, P. (2016). Reactivity of Diterpenoid Quinones: Royleanones. *Current Pharmaceutical Design*, 22(12), 1682–1714. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151211094521>

Leão, M., Soares, J., Gomes, S., Raimundo, L., Ramos, H., Bessa, C., et al., (2015). Enhanced cytotoxicity of prenylated chalcone against tumour cells via disruption of the p53 – MDM2 interaction. *Life Sciences*, 142, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.015>

Lee, J. W., Lee, M. S., Kim, T. H., Lee, H. J., Hong, S. S., Noh, Y. H., et al., (2007). Inhibitory Effect of Inflexinol on Nitric Oxide Generation and iNOS Expression via Inhibition of NF-κB Activation. *Mediators of Inflammation*, 2007, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2007/93148>

Lim, J.-Y., Sul, D., Hwang, B. Y., Hwang, K. W., Yoo, K.-Y., & Park, S.-Y. (2013). Suppression of LPS-induced inflammatory responses by inflexanin B in BV2 microglial cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 91(2), 141–148. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0242>

Liu, B., & Hong, J.-S. (2003). Role of Microglia in Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Strategies for Therapeutic Intervention. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 304(1), 1–7. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.035048.logical>

Lukhoba, C. W., Simmonds, M. S. J., & Paton, A. J. (2006). *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.011>

Madrid, L. V., Mayo, M. W., Reuther, J. Y., & Baldwin, A. S. (2001). Akt Stimulates the Transactivation Potential of the RelA/p65 Subunit of NF- κ B through Utilization of the I κ B Kinase and Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase p38. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 18934–18940. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101103200>

Magaldi, S., Mata-Essayag, S., Capriles, C. H. de, Perez, C., Colella, M. T., Olaizola, C., et al., (2004). Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>

Maistry, K. (2003). THE ANTIMICROBIAL PROPERTIES AND CHEMICAL COMPOSITION OF LEAF ESSENTIAL OILS OF INDIGENOUS *PLECTRANTHUS* (LAMIACEAE) SPECIES [Resumo]. Tese apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Witwatersrand, para obtenção do grau de mestre, Joanesburgo.

Marques, C. G., Pedro, M., Simões, M. F. A., Nascimento, M. S. J., Pinto, M. M. M., & Rodríguez, B. (2002). Effect of Abietane Diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on the Growth of Human Cancer Cell Lines. *Planta Medica*, 68(9), 839–840. <https://doi.org/10.1055/s-2002-34407>

Mashfiya, H., & Haroon, M. (2016). ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Plectranthus zeylanicus*. *5th Annual Science Research Sessions*, 225–230.

Matias, D., Nicolai, M., Saraiva, L., Pinheiro, R., Faustino, C., Diaz-Lanza, A., et al., (2019). Cytotoxic Activity of Royleanone Diterpenes from *Plectranthus madagascariensis* Benth. *ACS Omega*, 4(5), 8094–8103. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00512>

Matu, E. N., & Van Staden, J. (2003). Antibacterial and anti-inflammatory activities of some plants used for medicinal purposes in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 87(1), 35–41. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00107-7](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00107-7)

McGeer, P. L., Kawamata, T., Walker, D. G., Akiyama, H., Tooyama, I., & McGeer, E. G. (1993). Microglia in Degenerative Neurological Disease. *Glia*, 7(1), 84–92. <https://doi.org/10.1002/glia.440070114>

Mehrotra, R., Vishwakarma, R. A., & Thakur, R. S. (1989). ABIETANE DITERPENOIDS FROM *COLEUS ZEYLANICUS*. *Phytochemistry*, 28(11), 3135–3137. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80293-6](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80293-6)

Menon, D. B., & Gopalakrishnan, V. K. (2015). Terpenoids Isolated From the Shoot of *Plectranthus hadiensis* Induces Apoptosis in Human Colon Cancer Cells Via the Mitochondria-Dependent Pathway. *Nutrition and Cancer*, 67(4), 697–705. <https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1019631>

Menon, D. B., & Sasikumar, J. M. (2011). PHARMACOGNOSTIC STUDY AND PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF *PLECTRANTHUS HADIENSIS*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(5), 300–304. Obtido de <http://www.ijppsjournal.com/Vol3Suppl5/2797.pdf>

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & McLaughlin, J. L. (1982). Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*, 45(5), 31–34. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971236>

Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.007>

Mothana, R. A. A., Abdo, S. A. A., Hasson, S., Althawab, F. M. N., Alaghbari, S. A. Z., & Lindequist, U. (2010). Antimicrobial, Antioxidant and Cytotoxic Activities and Phytochemical Screening of Some Yemeni Medicinal Plants. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 7(3), 323–330. <https://doi.org/10.1093/ecam/nen004>

Muraina, I. A., Suleiman, M. M., & Eloff, J. N. (2009). Can MTT be used to quantify the antioxidant activity of plant extracts? *Phytomedicine*, 16, 665–668. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.11.005>

Napagoda, M., Gerstmeier, J., Wesely, S., Popella, S., Lorenz, S., Scheubert, K., et al., (2014). Inhibition of 5-lipoxygenase as anti-inflammatory mode of action of *Plectranthus zeylanicus* Benth and chemical characterization of ingredients by a mass spectrometric approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 800–809. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.11.004>

Nogueira, C. R., & Lopes, L. M. X. (2011). Antiplasmodial Natural Products. *Molecules*, 16, 2146–2190. <https://doi.org/10.3390/molecules16032146>

Ntungwe, E. N., Bessa, C., Garcia, C., Teodósio, C., Oliveira, C., Oliveira, C., et al., (2018). *7 α -acetoxo-6 β -hydroxyroyleanone* from *Plectranthus ramosior*: a screening study for anticancer lead molecules. *Planta medica*, *In preparation*.

Ntungwe, E. N., Marçalo, J., Garcia, C., Reis, C., Teodósio, C., Oliveira, C., et al., (2017). Biological activity screening of seven *Plectranthus* species. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 14(1), 95–108. <https://doi.org/10.19277/BBR.14.1.153>

Onguéné, P. A., Ntie-Kang, F., Lifongo, L. L., Ndom, J. C., Sippl, W., & Mbaze, L. M. (2013). The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part I: a pharmacological evaluation of alkaloids and terpenoids. *Malaria Journal*, 12(449), 1–25.

Orhan, I., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yilmaz, G., Kan, Y., et al., (2007). Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry*, 103(4), 1247–1254. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.030>

Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2007). Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement. *Talanta*, 71(3), 1155–1165. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.06.015>

Pan, L., Chai, H., & Kinghorn, A. D. (2010). The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochemistry Letters*, 3(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2009.11.005>

Pasoski, E. (2009). Phytochemical and Pharmacological Aspects of Australian *Plectranthus* sp. Tese apresentada à Universitat Wien para obtenção do grau de mestre, orientada por Prof. Dr. Gerhard Buchbauer, Viena.

Paton, A., Mwanyambo, M., & Culham, A. (2018). Phylogenetic study of *Plectranthus*, *Coleus* and allies (Lamiaceae): taxonomy, distribution and medicinal use. *Botanical Journal of the Linnean Society*, XX, 1–22. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy064>

Pereira, M., Matias, D., Pereira, F., Reis, C. P., Simões, M. F., & Rijo, P. (2015). Antimicrobial screening of *Plectranthus madagascariensis* and *P. neochilus* extracts. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 12(1), 127–138. <https://doi.org/10.19277/BBR.12.1.111>

Pfaller, M. A., Sheehan, D. J., & Rex, J. H. (2004). Determination of Fungicidal Activities against Yeasts and Molds: Lessons Learned from Bactericidal Testing and the Need for Standardization. *Clinical Microbiology*, 17(2), 268–280. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.268>

Pisoschi, A. M., Cheregi, M. C., & Danet, A. F. (2009). Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches. *Molecules*, 14(1), 480–493. <https://doi.org/10.3390/molecules14010480>

Plenderleith, I. H., MD, & FRCPC. (1990). Treating the Treatment: Toxicity of Cancer Chemotherapy. *CAN. FAM. PHYSICIAN*, 36, 1827–1830. Obtido de <http://www.worldcat.org/oclc/700264482>

Podolski-Renic', A., Anpelkovic', T., Bankovic', J., Tanic', N., Ruzdijic', S., & Pesic, M. (2011). The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 65, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2011.04.015>

Rasikari, H. L. (2007). Phytochemistry and arthropod bioactivity of Australian lamiaceae [Resumo]. Tese apresentada à Escola de Medicina Natural e Complementar da Universidade Southern Cross para obtenção do grau de doutor, Lismore.

Ren, Y., Houghton, P. J., Hider, R. C., & Howes, M.-J. R. (2004). Novel Diterpenoid Acetylcholinesterase Inhibitors from *Salvia miltiorhiza*. *Planta Medica*, 70(3), 201–204. <https://doi.org/10.1055/s-2004-815535>

Rice, L. J., Brits, G. J., Potgieter, C. J., & Staden, J. Van. (2011). *Plectranthus*: A plant for the future? *South African Journal of Botany*, 77(4), 947–959. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2011.07.001>

Rijo, P. D. de M. (2010). PHYTOCHEMICAL STUDY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF DITERPENES AND DERIVATIVES FROM *PLECTRANTHUS* SPECIES. Tese apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para obtenção do grau de doutor, orientada por Prof. Dr^a Maria de Fátima Alfaiate Simões, Lisboa.

Rijo, P., Batista, M., Matos, M., Rocha, H., Jesus, S., & Simões, M. F. (2012). Screening of antioxidant and antimicrobial activities on *Plectranthus* spp. extracts. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 9(2), 225–235.

Rijo, P., Duarte, A., Francisco, A. P., Semedo-Lemsaddek, T., & Simões, M. F. (2013b). *In Vitro* Antimicrobial Activity of Royleanone Derivatives Against Gram-Positive Bacterial Pathogens. *Phytotherapy Research*, 28(1), 76–81. <https://doi.org/10.1002/ptr.4961>

Rijo, P., Falé, P. L., Serralheiro, M. L., Simões, M. F., Gomes, A., & Reis, C. (2014). Optimization of medicinal plant extraction methods and their encapsulation through extrusion technology. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, 58, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2014.08.045>

Rijo, P., Faustino, C., & Simões, M. F. (2013a). Antimicrobial natural products from *Plectranthus* plants. *Formatex Research Center*, 922–931.

Rijo, P., Simões, M. F., Francisco, A. P., Rojas, R., Gilman, R. H., Vaisberg, A. J., et al., (2010). Antimycobacterial Metabolites from *Plectranthus*: Royleanone Derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* Strains. *Chemistry and Biodiversity*, 7(4), 922–932. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900099>

Ritter, F. J., & Meyer, G. M. (1962). PREPARATIVE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY AS AN ALTERNATIVE FOR COLUMN CHROMATOGRAPHY. *Nature*, 193(4819), 941–942.

Rosa, S., Correia, V., Ribeiro, I., Rijo, P., Simões, F., Saraiva, N., et al., (2015). *In vitro* antioxidant properties of the diterpenes Parvifloron D and 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 12(1), 59–67. <https://doi.org/10.19277/bbr.12.1.104>

Sarah, Q. S., Anny, F. C., & Misbahuddin, M. (2017). Brine shrimp lethality assay. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(2), 186–189. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.32796>

Silva, S. M. S. da. (2015). *INTOXICAÇÕES POR INIBIDORES DA ACETILCOLINESTERASE: ETIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO* [Resumo]. Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para obtenção do grau de mestre, orientada por Prof. Dr^a Helena Teixeira e Prof. Dr^o Francisco Corte Real, Coimbra. Obtido de <http://estudogeral.sib.uc.pt/jspui/handle/10316/30481>

Singh, S. B., & Barrett, J. F. (2006). Empirical antibacterial drug discovery - Foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*, 71(7), 1006–1015. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.12.016>

Soares, J., Pereira, N. A. L., Monteiro, Â., Leão, M., Bessa, C., Santos, D. J. V. A. dos S., et al., (2014). Oxazoloisoindolinones with in vitro antitumor activity selectively activate a p53-pathway through potential inhibition of the p53 – MDM2 interaction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, (October), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.10.006>

Soyza, W. S. G. de, Wijayaratne, W. M. D. G. B., Napagoda, M. T., & Witharana, S. (2016). Biosynthesis of silver and zinc oxide nanoparticles from *Plectranthus zeylanicus* for the development of antimicrobial formulations. *International Research Symposium on Pure and Applied Sciences*, 116.

Sripathi, R., & Ravi, S. (2017). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil from the Seeds of *Plectranthus hadiensis*. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9(5), 637–639. <https://doi.org/10.25258/phyto.v9i2.8140>

Sung, S. H., Kang, S. Y., Lee, K. Y., Park, M. J., Kim, J. H., Park, J. H., et al., (2002). (+)- α -Viniferin, a Stilbene Trimer from *Caragana chamlague*, Inhibits Acetylcholinesterase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(1), 125–127. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.125>

Tabet, N. (2006). Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease: anti-inflammatories in acetylcholine clothing! *Age and Ageing*, 35(4), 336–338. <https://doi.org/10.1093/ageing/afl027>

Tardelli, M. A. (2002). TRANSMISSÃO NEUROMUSCULAR: ANATOMIA, FISIOLOGIA E BLOQUEIO. *Bloqueadores Neuromusculares- Bases Científicas e Uso Clínico em Anestesiologia, I*, 13–33.

Tewary, P., Gunatilaka, A. A. L., & Sayers, T. J. (2016). Using natural products to promote caspase-8-dependent cancer cell death. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 66(2), 223–231. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1855-0>

Topcu, G., & Ulubelen, A. (2007). Structure elucidation of organic compounds from natural sources using 1D and 2D NMR techniques. *Journal of Molecular Structure*, 834–836(SPEC. ISS.), 57–73. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2006.12.001>

Trouillas, P., Calliste, C.-A., Allais, D.-P., Simon, A., Marfak, A., Delage, C., et al., (2003). Antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative properties of sixteen water plant extracts used in the Limousin countryside as herbal teas. *Food Chemistry*, 80(3), 399–407. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00282-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00282-0)

Ulubelen, A., Birman, H., Öksüz, S., Topçu, G., Kolak, U., Barla, A., et al., (2002). Cardioactive Diterpenes from the Roots of *Salvia eriophora*. *Planta Medica*, 68(9), 818–821. <https://doi.org/10.1055/s-2002-34408>

Urzúa, A., Rezende, M. C., Mascayano, C., & Vásquez, L. (2008). A Structure-Activity Study of Antibacterial Diterpenoids. *Molecules*, 13(4), 882–891. <https://doi.org/10.3390/molecules13040822>

Valgas, C., Souza, S. M. de, Smânia, E. F. A., & Jr., A. S. (2007). SCREENING METHODS TO DETERMINE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NATURAL PRODUCTS. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369–380. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822007000200034>

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature*, 1(3), 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>

Waldia, S., Joshi, B. C., Pathak, U., & Joshi, M. C. (2011). The Genus *Plectranthus* in India and Its Chemistry. *Chemistry and Biodiversity*, 8(2), 244–252. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201000048>

White, N. J. (2004). Antimalarial drug resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(8), 1084–1092. <https://doi.org/10.1172/JCI200421682.1084>

Xiao, Z. Y., Mu, Q., Shiu, W. K. P., Zeng, Y. H., & Gibbons, S. (2007). Polyisoprenylated Benzoylphloroglucinol Derivatives from *Hypericum sampsonii*. *Journal of Natural Products*, 70(11), 1779–1782. <https://doi.org/10.1021/np0704147>

Xie, W.-D., Li, X., Zhao, J.-H., Liu, Y.-H., & Row, K. H. (2012). Abietane diterpenoids from *Isodon inflexus*. *Phytochemistry*, 81, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.05.033>

Yang, Y.-C., Wei, M.-C., & Huang, T.-C. (2012). Optimisation of an Ultrasound-assisted Extraction Followed by RP-HPLC Separation for the Simultaneous Determination of Oleanolic Acid, Ursolic Acid and Oridonin Content in *Rabdosia rubescens*. *Phytochemical Analysis*, 23(6), 627–636. <https://doi.org/10.1002/pca.2365>

Yulianto, W., Andarwulan, N., Giriwono, P. E., & Pamungkas, J. (2016). HPLC-Based Metabolomics to Identify Cytotoxic Compounds from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against Human Breast Cancer MCF-7Cells. *Journal of Chromatography B*. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.024>

Zyl, R. L. van, Khan, F., Edwards, T. J., & Drewes, S. E. (2008). Antiplasmodial activities of some abietane diterpenes from the leaves of five *Plectranthus species*. *South African Journal of Science*, (February), 104, 62–64.

Anexos

Anexo I: Artigo de revisão- Naturally Occurring *Plectranthus*-derived Diterpenes with Antitumoral Activities

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Pharmaceutical Design, 2018, 24, 1-30

1

REVIEW ARTICLE

Naturally Occurring *Plectranthus*-derived Diterpenes with Antitumoral Activities

Catarina Garcia^{a,b}, Catarina Teodósio^a, Carolina Oliveira^a, Cláudia Oliveira^a, Ana Díaz-Lanza, Catarina Reis^c and Noélia Duarte^c and Patrícia Rijo^{a,c}

^aCenter for Research in Biosciences & Health Technologies (CBIOS), Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 1749-024 Lisboa, Portugal; ^bDepartment of Biomedical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Alcalá, Campus Universitario, 28871 Alcalá de Henares, Spain; ^cInstituto de Investigação do Medicamento (iMed.Ulisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisboa, Portugal

Abstract: The study of natural sources such as plants, microorganisms and marine organisms has developed interest among the scientific community in recent years for their extensive and diverse chemical composition and consequent biological potential. The search for antitumor compounds is among the lead causes that justify phytochemical studies. Although some natural products have served as FDA approved chemotherapeutic agents, there is still a demand for the search of compounds with those characteristics.

ARTICLE HISTORY

Received: December 01, 2018
Accepted: January 02, 2019

DOI:

10.2174/1381612825666190115144241

The *Plectranthus* genus has long been used in traditional medicine, and scientific studies have already proven its undeniable value as a source of bioactive compounds. Diterpenes are the most prominent biologically active group of secondary metabolites present in this genus. In particular, abietane diterpenes have long been studied for their biological activities, namely their anti-tumoral potential. In this review, abietane diterpenes isolated from *Plectranthus* genus with antiproliferative, antitumoral or cytotoxic potential are reported. In addition, a correlation between this subclass of diterpenes with their mechanisms of cell death has been discussed.

Keywords: *Plectranthus*, Lamiaceae, abietane, diterpenes, antiproliferative.

1. INTRODUCTION

Despite remarkable progress in developing new therapeutic drugs, cancer still remains one of the leading causes of death worldwide [1, 2]. Biologically characterized by an abnormal multiplication of damaged cells, tumors are formed of malignant cells, often with the metastatic ability [3, 4].

Anticancer chemotherapeutic drugs are biologically effective but their inherent toxic effects on the host are long described [5]. As such, the ultimate goal of current cancer therapy relies on the selective killing of cancer cells, without causing any toxicity to nontumoral cells [6].

Medicinal plants are used in traditional medicine all over the world and in particular by Asian and African populations [3]. Their use in primary health care in developing communities has raised interest among the scientific community, in order to discover which compounds are responsible for the foreseen activities and therefore providing validation of their usage. For this reason, species from *Plectranthus* genus, have long been recognized for their cytotoxic and antitumor potential due to their bioactive secondary metabolites [3, 7, 8].

There are several plant-derived compounds with approved use for chemotherapy, but many of them present toxic patterns and undesirable side-effects. This fact has contributed to a high demand of novel antitumor agents in which plants play a notable role [1, 9, 10].

Plants have the ability to produce a variety of secondary metabolites that contribute to the defense response to external factors, and these include alkaloids, flavonoids, isoflavonoids, tannins,

coumarins and terpenes [11]. Terpenoids are the largest group of phytochemicals [12-14]. Five-carbon isoprene units define their biogenesis, and this type of compounds can be categorized into classes such as hemiterpenoids (C₅), monoterpenoids (C₁₀), sesquiterpenoids (C₁₅), diterpenoids (C₂₀), sesterterpenoids (C₂₅), triterpenoids (C₃₀) and tetraterpenes (C₄₀) [14, 15].

Structurally, diterpenes consist of four isoprene units (thus possessing 20 carbon atoms) and also four branched methyl groups. Their chemical categorization relies on several classes according to the cyclization of their core through geranylgeranyl diphosphate [13, 16, 17].

This class of metabolites is divided into acyclic or linear (phytanes), bicyclic (labdanes, halimanes, clerodanes), tricyclic (pimaranes, abietanes, cassanes, rosanes, vouacapanes, podocarpanes), tetracyclic (trachylobanes, kauranes, aphidicolanes, stemodanes, stemaranes, atisanes, gibberellanes), pentacyclic and macrocyclic diterpenes (taxanes, cembranes, daphnanes, tigllanes, ingenanes, lathyrane and jatrophane) [13, 16]. Their bioactivity varies immensely, but they share a common ground due to their pronounced health-related properties, such as anti-inflammatory, antioxidant, antibacterial, antidiabetic, insect antifeedant and anticancer, among many others [18, 19].

Their distribution in the plant kingdom is vast and they are commonly found in plants belonging to the Euphorbiaceae, Taxaceae and Lamiaceae families [8, 13, 20]. They often possess polyoxygenated different forms with keto or hydroxyl groups, esterified in some cases with aliphatic or aromatic acids [16].

Previous studies have reported that abietane diterpenoids, although present in many other species [21], are amongst the most diverse compounds found in the *Plectranthus* genus, mainly in leaf glands [18, 22, 23]. Therefore, the cytotoxic abietane diterpenes present in the aforementioned genus are herein highlighted aiming

*Address correspondence to this author at the CBIOS, Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande, 376, 1749-024 Lisboa, Portugal; Tel: +351 317 515 500; Fax: +351 217 577 006; E-mail: patricia.rijo@ulusofona.pt

also to elucidate the main mechanism for which cell death occurs after exposure to these metabolites.

2. PLANT-DERIVED NATURAL PRODUCTS APPROVED FOR CHEMOTHERAPY

More than 50% of the current drugs used for anticancer therapy derive from plants and its use has resulted in very large profits for the pharmaceutical industry [9, 24]. Nevertheless, their high toxic parameters and associated side effects is a drawback. Having in mind the geographical and biological diversity of plants, it is not surprising that the scientific community is centered on a quest for the demand of both novel compounds with cytotoxic potential and also selective targeting strategies [9].

Therefore, some natural products have been the focus of many studies for a long time. These studies have included the search of their mechanism of action and the unveiling of new cellular targets, which over the years has resulted in the approval of its established use in chemotherapy (Table 1) [9, 10]. There are some examples of cytotoxic terpenoids used in a clinical context. Among these, paclitaxel can be highlighted as one of the most important diterpenoids that are vastly used in chemotherapy for the treatment of a wide range of solid tumors [1, 25].

3. THE ANTICANCER POTENTIAL OF THE *PLECTRANTHUS* GENUS

The Lamiaceae family consists of about 200 genera, and is also the family of species in which most of the diterpenes are found [14]. The *Plectranthus* has more than 300 species spread around the globe, in particular, through Tropical Africa, Asia and Australia [8]. Given its geographic distribution and variety of species, it is no surprise that this genus has a vast biological diversity, and its ethnopharmacology has been heavily marked by its numerous uses in traditional medicine [7, 8, 28].

Among many activities such as antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, among others, some species have also been described for their cytotoxic and antitumor potential [8]. As a result, the *Plectranthus* genus has fostered many studies focusing on the cytotoxic potential of either extracts or isolated compounds. A great variety of species belonging to the Australian flora have been studied, and some *Plectranthus* *pp.* have recorded potent cytotoxic effects (*P. amoenus*, *P. fasciculatus*) [29] and a phytochemical study of *Plectranthus* *spp.* (*P. swynnertonii*, *P. welwitschii*, *P. woodii*, *P. cylindraceus*, *P. spicatus*, *P. ramosior* and *P. petiolaris*) acetonetic extracts has displayed interesting results when evaluating the toxicity of their extracts on *Artemia salina*, with LC_{50} ranging from 0.04 to 0.88 mg/L [30]. Also, a screening of a total of 26 extracts of *Plectranthus* was conducted for their cytotoxicity on MDA-MB-231 breast cancer cells [31]. Fairly good results were seen for *P. madagascariensis* acetonetic extract, and its components have been isolated and also tested with positive results [31, 32].

Overall, the cytotoxic or antiproliferative activities of *Plectranthus* derived extracts and compounds strongly suggest that its extensive chemical diversity leads to a broad biological value. Therefore, there is a high demand on exploring this genus for further biologically active compounds.

4. *PLECTRANTHUS* GENUS: DITERPENOID CHEMICAL VARIETY

The chemical composition of the *Plectranthus* genus is vast and complex, and among terpenes, diterpenes seem to be the most prominent group, with a notable chemical variety [22, 23].

7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (**1**) was found to be part of the secondary metabolism of *P. actites* [29, 33].

P. africanus can be found in regions like Uganda, Cameroon and Guinea-Bissau. In a recent phytochemical study, three new modified abietanes were identified as being plectranthroyleanones

A (**2**), B (**3**) and C (**4**) [34]. Plectranthroyleanone A (**2**) has demonstrated poor antimicrobial activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Nevertheless, both plectranthroyleanones B (**3**) and C (**4**) present moderate activity specially against *Klebsiella pneumoniae* [34].

Native from regions of India, *P. amboinicus* essential oil exhibited antifungal and antioxidant activities, but also chemotherapeutic effects [11, 35]. The analysis of its extract also revealed the presence of 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (**1**) [33]. A phytochemical study focused on the leaves of this plant demonstrated the presence of the acyclic diterpene phytol, the activities of which were described to be related to antimicrobial, diuretic, anti-inflammatory, anticancer properties [36].

P. barbatus is often used in traditional medicine as a treatment for intestinal disturbances and liver fatigue, respiratory disorders, heart diseases and certain central nervous system disorders [8]. From this species, the abietane-type dehydroabietane (**5**), taxodione (**6**) and 6 α , 11, 12, -trihydroxy-7 β , 20-epoxy-8, 11, 13-abietatriene (**7**) were isolated for the first time from *Plectranthus* genus. *P. barbatus* also enabled the isolation of 5, 6-didehydro-7-hydroxy-taxodone (**8**) and 20-deoxocarnosol (**9**) [37]. Barbatusol (**10**), cyclobutatusine (**11**), 3 β -hydroxy-3-deoxybarbatusin (**12**), barbatusin (**13**), 7 β -acetyl-12-desacetoxi-cyclobutatusine (**14**), 6 β -hydroxycarnosol (**16**) and plectrinone A (**16**) and B (**17**) were also isolated from this plant [38, 39]. In fact, plectrinone A (**16**) appeared to be able to inhibit the gastric proton pump, contributing to the antisecretory acid effect and popularly known antiulcer activity of this plant [40]. An extensive study on the pharmacology of *P. barbatus* indicated that abietanes are its major constituents, namely the labdane-type diterpene forskolin (**18**), which can be found in the roots of the plant [39, 41]. In that study, over 60 diterpenes were presented as taking part in the secondary metabolism of the plant. Coleons A (**19**), B (**20**), E (**21**), F (**22**), O (**23**), T (**24**), and S (**25**) and 14-deoxycoleon U (**26**) were isolated from this plant. Plectranthone J (**27**), abietatriene (dehydroabietane) (**5**), demethylcryptojaponol (11-hydroxysugiol) (**28**), sugiol (**29**), ferruginol (**30**), 20-deoxocarnosol (**9**) and caricol (**31**) were also reported to figure out the chemical composition of this plant [39, 42]. Diterpenes such as forskolin (**18**), isoforskolin (**32**), 1-deoxyforskolin (**33**) and 13-*epi*-sclareol (**34**) are diterpenoids that add value to the study of this plant [22]. Forskolin (**18**) is reported to inhibit lung metastasis of highly metastasizing B16 (F10) murine melanoma cells [43].

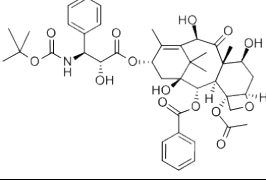
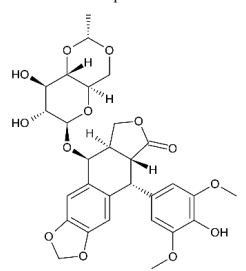
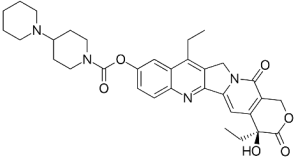
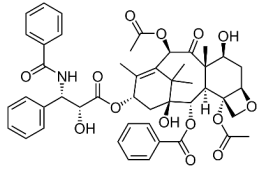
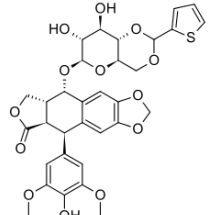
P. bishopianus is considered an endangered species in the western regions of India. The phytochemical study of its methanolic extract allowed the isolation of 6 β -hydroxy-7 α -methoxyroyleanone (**35**) for the first time. 6, 7-Dehydroroyleanone (**36**) and 6 β , 7 α -dihydroxyroyleanone (**37**) were also found to be present in the extract of this plant and in *P. argentatus* and *P. edulis* [23, 44].

P. caninus has long been described as a specie whose glands and racemes are a major source in the production of *spiro*-abietanes. A study conducted by Rüedi *et al.* demonstrated the existence of 5 coleons, such as, coleon M (**38**), N (**39**), P (**40**), Q (**41**), R (**42**), S (**43**) and T (**44**) along with barbatusin (**13**) [45]. The chemical composition of its essential oil has been studied as well, and camphor was identified as being the major component of the oil [46, 47].

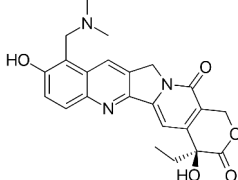
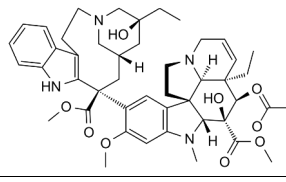
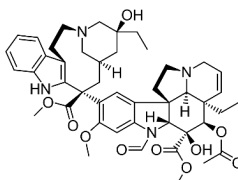
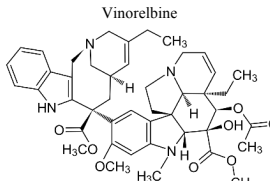
Kaurene-type diterpenes appeared to be the major constituents of *P. ciliatus*, although labdanes were also present in the plant. Nevertheless, the kaurene diterpene kaurenic acid (**43**) demonstrated moderate antibacterial activity against the Gram-positive methicillin-resistant and multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* [48].

The compound parvifloron D has been named after the plant from which *P. parviflorus* was isolated in 1978 [49]. However, this compound, along with parvifloron F (**44**), has also been found in

Table 1. Approved plant-derived chemotherapeutic agents.

Natural Product/Derivative Approved for Chemotherapy	Mechanism of Action	Chemical Structure (Class)/Botanical Source	Cancer Treatment Application [26, 27]
Docetaxel 	Microtubule disrupting agent	Diterpenoid derivative (Taxane)/ <i>Taxus brevifolia</i>	Breast cancer, Non-small cell lung cancer, Hormone Refractory prostate cancer, Gastric adenocarcinoma, Squamous cell carcinoma of the Head and Neck Cancer
Etoposide 	Topoisomerase II inhibitor	Semisynthetic derivative of podophyllotoxin (Lignan)/ <i>Podophyllum peltatum</i>	Refractory testicular tumours, Small cell lung cancer
Irinotecan 	Topoisomerase I inhibitor	Alkaloid (Camptothecin analog)/ <i>Camptotheca acuminata</i>	Metastatic carcinoma of the colon or rectum
Paclitaxel 	Microtubule disrupting agent	Diterpenoid derivative (Taxane)/ <i>Taxus brevifolia</i>	Breast cancer, Ovarian cancer, Non-small cell lung cancer
Teniposide 	Topoisomerase II inhibitor	Semisynthetic derivative of podophyllotoxin (Lignan)/ <i>Podophyllum peltatum</i>	Refractory childhood acute lymphoblastic leukemia

(Table 1) Contd....

Natural Product/Derivative Approved for Chemotherapy	Mechanism of Action	Chemical Structure (Class)/Botanical Source	Cancer Treatment Application [26, 27]
Topotecan 	Topoisomerase I inhibitor	Alkaloid (Camptothecin analog)/ <i>Camptotheca acuminata</i>	Cervical cancer
Vinblastine 	Microtubule disrupting agent	Alkaloid (Vinca alkaloid)/ <i>Catharanthus rosea</i>	Breast cancer, Choriocarcinoma, Hodgkin lymphoma, Kaposi sarcoma, Non-Hodgkin lymphoma, Testicular cancer
Vincristine 	Microtubule disrupting agent	Alkaloid (Vinca alkaloid)/ <i>Catharanthus rosea</i>	Acute Leukemia Hodgkin's disease, non-Hodgkin's malignant lymphomas, rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, Wilms' tumor
Vinorelbine 	Microtubule disrupting agent	Alkaloid (Vinca alkaloid)/ <i>Catharanthus rosea</i>	Lung cancer, Breast cancer

other *Plectranthus* species, such as in the leaves of *P. ecklonii*, and their cytotoxicity was reported [50-53]. Sugirol (**29**) was also isolated from *P. ecklonii* [14]. There are many studies that state the effect of *P. ecklonii* and/or its compounds against the viability of cancer cells and microbial strains, thus indicating the biological significance of such plant [30, 50-56].

11-Hydroxy-12-oxo-7, 9(11), 13-abietatriene (**45**) and **7a**, 11-dihydroxy-12-methoxy-8, 11, 13-abietatriene (**46**) were isolated from the chloroformic extract of aerial parts

of *P. elegans*. A prominent activity was seen in the inhibition of the *Cladosporium cucumerinum* fungus sporulation, as well as growth inhibition of Gram-positive bacteria [57].

The methanolic extract of *P. diversus* has allowed the identification of the compound **7a**, 18-dihydroxy-isopimara-8(14), 15-diene (**47**) [29].

The methanolic extract of *P. fasciculatus* displayed cytotoxicity against D. mel-II cell lines. Although 6, 7-dihydroxyroyleanone (**37**) can be found in its extract, its cytotoxic activity was attributed

to the presence of coleon U (**48**) [29]. *P. forskohlii* on the other hand, possesses the diterpene coleon C (**49**), to which, tumoral toxicity is also associated [58].

P. fruticosus is traditionally used for the relief of burn injuries in the traditional Romanian medicine, although its origin is South Africa [8]. From the acetonic extract of this plant, four labdane and seven kaurene diterpenes were isolated. Kaurene-type diterpenes such as *ent*-3 β -acetoxylabda-8(17), 12Z, 14-trien-2 α -ol (**50**), *ent*-12 β -acetoxylabda-15 β -hydroxykaur-16-en-19-oic acid (**51**), *ent*-12 β -acetoxylabda-15 β -hydroxykaur-16-en-19-oic acid (**52**), *ent*-7 β -hydroxykaur-15-en-19-oic acid (**53**), and *ent*-12 β -acetoxylabda-15 β -hydroxykaur-15-en-19-oic acid (**54**) were also found [59, 60].

6 β , 7 α -Dihydroxyroyleanone (**37**) was found in *P. forsteri* 'Marginatus' and 6, 7-dehydroroyleanone (**36**) and coleon U (**48**) were isolated from both *P. forsteri* 'Marginatus' and *P. grandidentatus* [61, 62]. The latter diterpene was previously examined for its antimicrobial activity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistant *Enterococcus*

faecalis (VRE), *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas syringae* and also antifungal activity against *Cladosporium herbarum* [58]. Apart from coleon U (48), in the leaf-glands of *P. grandidentatus* it is possible to encounter the abietane diterpenes 14-hydroxytaxodione (55), coleon V (56) and structures of diterpenes such as grandidones A-D (57-60) and 7-epigrandidones A, B and D (61-63). Royleanone (64), 6, 7-dehydroroyleanone (36), horminone (65), 6 β -hydroxyroyleanone (66), and 7 α , 6 β -acetoxyroyleanone (1) were also present in this plant, along with 7 β -formyloxy-6 β -hydroxyroyleanone (67) [62, 63]. Their antibacterial activity and cytotoxic potential were also described [62, 64-67]. In addition, the extraction of 7 α , 6 β -acetoxyroyleanone (1) was optimized and this diterpene is now fully characterized regarding its structure and thermal behaviour [68]. From the acetonic extract of this plant, rhinocerotinoic acid (68) and the abietane 14-O-acetylcoleon U (69) were also isolated [69].

There are several studies regarding *P. hadiensis*, which have normally focused on its extracts, regarding their antimicrobial activity and *in vitro* cytotoxicity that were considered to be promising [70, 71]. In addition, its methanolic extract displayed high free radical scavenging activity whereas good results against Gram-positive bacteria were obtained for the acetonic extract [71, 72]. Other studies even related this activity to its terpenoid fraction [73]. Nevertheless, some studies indicated that *P. hadiensis* possesses in its chemical composition secondary metabolites such as 7 α -formyloxy-6, 12-dihydroxy-abieta-8, 12-diene-11, 14-dione (70), 7 α -acetoxy-6, 12-dihydroxy-abieta-8, 12-diene-11, 14-dione (71), 7 β -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (37), and 6 β , 7 β -dihydroxyroyleanone (72) [22, 53].

The roots of *P. hereroensis* have been used as an infusion by indigenous people in northern Mozambique as a popular remedy for the treatment of "liver disorders" [74]. From its roots, the abietane-type diterpenes horminone (65), acetoxihorminone (73), 7 α , 12-dihydroxy-17(15-16)abeo-abieta-8, 12, 16-triene-11, 14-dione (70) and 16-acetoxy-7 α , 12-dihydroxy-8, 12-abietadiene-11, 14-dione (71) were isolated. Horminone (65) was related to an antimicrobial profile [62] specially against *S. aureus* [23, 56, 62]. 16-Acetoxihorminone (73) also exists in this plant, but horminone (65) is believed for being responsible for its antimicrobial profile [62] specially against *S. aureus* [23, 56, 62]. The known compounds grandidone A (57), 6 β , 7 α -dihydroxyroyleanone (37), 7-epigrandidone A (61), and 16-acetoxy-7 α -hydroxyroyleanone (74) were also obtained from *P. hereroensis* [63].

The chemical composition of *P. lanuginosus*, an eastern tropical African plant, has been extensively described [23, 63]. In 1982, Schmid *et al.*, highly contributed to the current phytochemical knowledge of this plant, and reported the existence of twenty-two compounds, namely, lanugones A - S (75-93), (15S)-coleon C (94) and (15S)-coleon D (95), isolated from the leaf-glands [75]. Coleon G, J, O and Y (96, 97, 23, 98), and also 3-O-desacetyl-3-O-formylcoleon Y (99), 12-O-desacetyl-coleone Q (100) (or 15-epilangunon F), 7-O-acetyl-12-O-desacetyl-19-hydroxy-coleone Q (101), 18-acetoxy-12-O-desacetyl-coleone Q (102) bis(abeo)-royleanone (103), di-abeo-7 α -methoxy-royleanone (104) and 6 β , 7 α -dihydroxy(allyl)royleanone (105) were also reported [63].

P. madagascariensis is a southern African perennial aromatic herb traditionally used for the treatment of scabies, small wounds and respiratory problems [7, 76]. The main constituent of the essential oil of this plant is the diterpene 6, 7-dehydroroyleanone (36) [76, 77], the extraction of which can be optimized with the use of a Clevenger-type apparatus [78]. Interestingly, having a diterpene as the major component of the essential oil of this plant is not common, given that phytochemical studies performed in other *Plectranthus* species stated that the main constituents of these volatile mixtures are phenolic compounds, monoterpenes and sesquiterpenes [22, 41]. The phytochemical study of the acetonic extract of this

plant allowed the isolation of coleon U (48) and 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (1) [31]. Moreover, from its methanolic extract coleon-U-quinone (130) and also the highly oxidized antimicrobial 7 β , 6 β -dihydroxyroyleanone (90) and 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (1) and coleon-U-quinone (107) abietanes were isolated [19, 76].

Parvifloron E (108) and F (44) and two new diterpenes, plectranthol A (109) and B (110), were isolated from *P. nummularius*, also known as *P. verticillatus* [8, 79]. When screened through the scavenging method of the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), the latter compounds displayed antioxidant properties with better results than those recorded for α -tocopherol [58].

Although with few traditional medicine applications in Africa, *P. ornatus* is used in some regions of Brazil [80]. 6-O-acetylforskolin (111), 1, 6-di-O-acetyl-9-deoxyforskolin (112) and 1, 6-di-O-acetylforskolin (123) were also found in the acetonic extract of this plant [81]. In addition, a halimane derivative was also discovered to be present in the whole plant: the 11R*-acetoxyhalima-5, 13E-dien-15-oic acid (114), along with a coleon-based compound (14-O-acetylcoleon U (69)) [69]. Besides halimane, neocleradane and labdane diterpenes also take part in the chemical composition of this plant: the plectronatins A - c (115-117) are secondary metabolites that can be isolated from the acetonic extract of this species, and are known for possessing antimicrobial properties [8, 82, 83]. The labdane rhinocerotinoic acid (68) was also found to be present in this plant [52, 80]. The latter has displayed interesting results regarding the inhibition of the COX-1 [80].

The study of a methanol/dichloromethane (1:1) extract of the root of *P. punctatus* reported the presence of the known diterpenoids royleanone, 7 β -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (71), 6 β , 7 α -dihydroxyroyleanone (37), 7 β -acetoxy-6 β -hydroxy-12-O-methylroyleanone (120), 6, 7-dehydroroyleanone (36), demethylinuroyleanol (122), coleon V (56) and 1 α , 5 α -dihydroxymanoyl oxide (123). Moreover, *p*-benzoquinone containing abietane-type diterpenoids such as 6 β , 7 β -dihydroxyroyleanone (72) was also isolated [84].

The abietanes 11-hydroxy-19-(methyl-buten-2-oyloxy)-abieta-5, 7, 9(11), 13-tetraene-12-one (124), 11-hydroxy-19-(4-hydroxybenzoyloxy)-abieta-5, 7, 9(11), 13-tetraene-12-one (125) and 11-hydroxy-19-(3, 4-dihydroxybenzoyloxy)-abieta-5, 7, 9(11), 13-tetraene-12-one (126) were isolated from the leaves of the southern African plant, *P. purpuratus* (subsp. *purpuratus* and subsp. *tongaensis*) and their activity is described regarding their anti-malarial potential [53]. Despite this study, kaurene diterpenes were also reported, but very little is known regarding the biological potential of these diterpenoids [8].

Beyerane diterpenes such as *ent*-3 β -(3-methyl-2-butenoyloxy)-15-beyerene-19-oic acid (127) and *ent*-7 α -acetoxy-15-beyerene-18-oic acid (128) were isolated from *P. saccatus*. Their insect antifeedant activity was assessed and interesting results were obtained against *Spodoptera littoralis* [19, 85].

P. sanguineus has horticultural use, but its glandular trichomes have already been studied and screened for the presence of diterpenes, in particular those with an abietane skeleton. Seventeen quinones and hydroquinones were isolated and identified, including grandidone A and B (57, 58), epigrandidone A and B (61, 62), 14-hydroxytaxodione (55), 7-O-formylhorminone (129) (or 7 α -formyloxy-6 β -hydroxyroyleanone). The secondary metabolites horminone (82), sanguinone A (154), coleon D (95), V (56), *cis*-coleon V (155), coleon-U-quinone (107), 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (1), 6 β , 7 α -dihydroxyroyleanone (37), 6 β -hydroxyroyleanone (66), and 8 α , 9 α -epoxycoleon-U-quinone (121) were also found [63, 86]. In addition, the presence of 6 β , 7 α -dihydroxy(allyl)royleanone (105), 8 α , 9 α -epoxy-8, 9-dihydrocoleon-U-quinone (156) and 16-O-acetylcoleon D (131) was reported [23].

A different range of parvifloron-type diterpenes was found in *P. strigosus* (former *P. parviflorus*): parviflorons A, B, E, F, G and H [132, 133, 106, 44, 134, 135] that are directly associated to the chemistry of this plant [51, 87]. Furthermore, other phytochemical studies have identified the presence of compounds belonging to two different classes of diterpenes: *ent*-kaurenes and abietanes. Concerning the first mentioned class, *ent*-16-kauren-19-ol (136), *ent*-16-kauren-19-oic (137), xylopic and xylopinic acids (138, 139) were ascertained. The abietane class, however, was composed of parvifloron D (106) and hynokiol (140), to which antioxidant activity is associated [58, 88].

5. ABIETANE DITERPENES - A CLASS OF DITERPENOIDS

Several classes of diterpenoids can be found in the *Plectranthus* genus - abietane, beyerene, clerodane, halimane, kaurene, labdane and pimarane [52, 81].

Often isolated, the abietane class of diterpenes has been reported as the major genus [52, 89], and its diversity and bioactivity were extensively described [31, 32, 54, 62, 63, 72, 89-92].

Despite the variety of compounds, the largest group of naturally occurring abietane diterpenes comprise the aromatic ones [58], which possess an aromatic C ring containing phenols or quinones, and a variety of different degree of oxygenation at several positions [19]. This class of compounds gathers different families, namely royleanones, spirocoleons and quinones [29], to which a variety of activities is associated. Below the abietane diterpenes found in *Plectranthus*, that demonstrated potential antitumor activity are described.

6. PLECTRANTHUS-DERIVED ABIETANE DITERPENES WITH ANTITUMOR ACTIVITY

Mogib *et al.*, have extensively described the chemical composition of the *Plectranthus* genus [23]. Nevertheless, despite the biological diversity and diterpene content of this genus, not all compounds reveal the same potential regarding their anti-proliferative effects. In this review, not only we highlight all diterpenes isolated from this genus, as we also focused on the search of cytotoxic *Plectranthus*-derived abietane diterpenes.

Royleanones are abietane-type diterpenes with a hydroxy-*para*-quinone moiety, which have been named after the isolation of a yellow pigment derived from the plant *Inula royleana*, in 1962. The presence of a chromophoric system, due to the existence of a benzoquinone moiety, is a common characteristic to these diterpenes and it is mainly responsible for their natural pigment [63]. This group of compounds is considered to be one of the main constituents of species belonging to *Plectranthus* genus [63]. In addition, it is known that the ability of quinones inducing cytotoxicity demands its reductive bio activation by a one-electron mechanism to the corresponding semiquinone free radicals, which are mediated by several enzymes [74].

Royleanone (64), horminone (65) and 7 α -acetoxyroyleanone (141) (also called 7-*O*-acetylhorminone) have been described for their cytotoxic potential and DNA-damaging ability in human colon carcinoma cells Caco-2 and human hepatoma cells HepG2 [93]. All these quinones decreased the viability of the mentioned cells, and their apoptotic effect was comparable to the one noticed by a topoisomerase I inhibitor in HepG2 cells [93].

Also, horminone (65) has long been described as an abietane with cytotoxic profile [74] and further studies have revealed moderate to high toxicity on 3T3 cells and *Vero* cells and in P-388 murine cells [28, 94-96].

Sugiol (29) is an abietane diterpene that was firstly isolated in this genus in 2011, from *P. ecklonii* [14]. It showed to have moderate activity against human breast, lung and colon cancer cell lines [97]. Sugiol (29) and 7-ketoroyleanone (142) were both studied and re-

garded as very active on human DNA topoisomerases I and II, although with preferable inhibition of the first protein [98]. When compared to camptothecin, a typically used topoisomerase I inhibitor used as positive control, these compounds exhibited a lower IC₅₀, thus indicating higher inhibitory activity than camptothecin [98].

Along with 7-ketoroyleanone (142), other royleanones such as 7 α -acetoxyroyleanone (167) and royleanone (64), demonstrated cytotoxicity associated with a *para*-naphthoquinone moiety which has been considered responsible for cytotoxic and anti-proliferative activity against human cancer cell lines [99].

Additionally, a comparative study between royleanones 7 α -acetoxyroyleanone (141), 7-ketoroyleanone (142), horminone (65) and royleanone (64) has revealed that 7 α -acetoxyroyleanone (141) displayed an overall highest cytotoxic profile in human pancreatic (MIAPaCa-2) and melanoma (MV-3) tumoral cell lines, with IC₅₀ ranging from 4.7 and 7.4 μ M, respectively [98]. Horminone (65), 7 α -acetoxyroyleanone (141), and royleanone (64) featured the least cytotoxic profile on both cell lines, when compared to the aforementioned abietanes [98].

Other quinonic diterpenes of the royleanone type such as 6, 7-dehydroroyleanone (36) and royleanone (64) showed to be highly cytotoxic against the nasopharynx carcinoma and P-388 leukaemia cell lines [96]. Furthermore, 6, 7-dehydroroyleanone (36) is present in different *Plectranthus* sp., namely *P. amboinicus* [23] and has been considered to be selectively cytotoxic towards HL60 cell lines [100]. In other studies, the abietane diterpene 6, 7-dehydroroyleanone (36) showed a remarkable *in vitro* anti-proliferative activity against human prostate cancer cell line (PC3), with an IC₅₀ of 6.56 $\pm$ 0.43 μ M, and considerable cytotoxicity against human cervical cancer cell lines (HeLa), with an IC₅₀ 9.42 $\pm$ 0.33 μ M. Also, when tested on normal mouse fibroblast cells (3T3), this compound was considered non-toxic [101]. 6, 7-dehydroroyleanone (36) can be found in *P. madagascariensis* essential oil [77, 78]. Recent studies indicated that this compound is cytotoxic against different cell lines (namely, NCI-H460, NCI-H460/R, MRC-5, A549, MOLT-3 and HL-60) and that, although not targeting microtubules, it is able to evade the resistance mechanisms associated with P-glycoprotein, which is often responsible for the failure of many currently applied chemotherapies [78].

Taxodione (6) can be found in *P. barbatus* [37] and showed activity against HeLa and Hep-2 cell lines, and has also decreased viability against the leukemic K562 and HL-60 cancer cells, in which, an increase in the expression of the Bax protein was recorded [42, 102, 103]. Also found in *P. barbatus* [104], ferruginol (30) had similar effects to those recorded by taxodione (6) in these leukemic cell lines [42, 103]. Both compounds demonstrated to induce apoptotic cell death, visible through the increase of DNA fragmentation and over 80% of apoptotic cell populations [42]. Interestingly, these abietanes were able to induce apoptosis through the mitochondrial or intrinsic caspase-dependent apoptotic cascade, proven by the increase in the expression of the Bax protein and clavation of the caspase-3 [42]. Despite the demonstrated activity against the aforementioned cell lines, taxodione (6), ferruginol (30) and also royleanone (64) have not shown relevant activity on monkey kidney fibroblasts (VERO cells) [105].

An HPLC-based metabolomics composition study was performed in order to identify the main cytotoxic compounds present in *P. amboinicus* extracts [33]. When subjecting MCF-7 breast cancer cell lines to 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (1), cytotoxic and anti-proliferative activity was observed. Also, this royleanone was regarded as the main compound contributing to the foreseen cytotoxic activity of the extract, thus inhibiting the viability of these cancerous cells [33]. The prevalence of this compound is vast since it had been previously isolated from other *Plectranthus* species, such as *P. grandidentatus*, *P. sanguineus*, and *P. argen-*

tatus, among others [33]. 7 α -Acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (**1**) - along with coleon U (**48**) has also been related to the cytotoxic activity observed in the acetonic extract of *P. madagascariensis* [32].

Along with 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (**1**), 6 β , 7 α -dihydroxyroyleanone (**37**) also revealed cytotoxicity against different cell lines [76]. This abietane showed moderate to high cytotoxicity in 3T3 and Vero cells [94].

Additionally, a comparative study on the effect of four different abietanes isolated from *P. grandidentatus* was also carried out [66]. Their effect on the proliferation of human T- and B-lymphocytes of 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (**1**), 7 α -acyloxy-6 β -hydroxyroyleanone (**143**), and coleon U (**48**) was assessed, and a dose-dependent suppressor effect was recorded with a preferential inhibition of T-lymphocyte proliferation [66]. These compounds along with 6 β , 7 α -dihydroxyroyleanone (**37**) were also tested against MCF-7, NCI-H460, SF268, TK-10 and UACC-62 tumoral cell lines. Coleon U (**48**) exhibited the strongest inhibitory effect and 7 α -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (**1**) has also revealed an overall considerable inhibitory effect. On the other hand, 7 α -acyloxy-6 β -hydroxyroyleanone (**143**) and 6 β , 7 α -dihydroxyroyleanone (**37**) did not show significant growth inhibition [65].

Other abietane type royleanones such as 7 β -hydroxyroyleanone (**118**), 6 β , 7 β -dihydroxyroyleanone (**72**), 7 β -acetoxyroyleanone (**119**), 7 β -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone (**71**), and 7 β -acetoxy-6 β -hydroxy-12-*O*-methylroyleanone (**120**) showed moderate cytotoxicity against human cervix carcinoma cell line KB-3-1, with IC₅₀ ranging from 13 to 52 μ M. Their activity was also compared with positive controls such as cryptophycin-52 and griseofulvin [84].

Coleon U (**48**) is a quinone methide abietane found in several species of the *Plectranthus* genus, such as *P. forsterii*, *P. grandidentatus*, *P. madagascariensis* and *P. myrianthus* [23, 106]. This diterpene is often regarded as a potent cytotoxic against several cell lines, including breast, leukemia and melanoma cells [32, 106, 107]. It has shown significant inhibitory activity against K562 human leukemia cells [108]. Its modulatory activity on individual isoforms of the three protein kinase C (PKC) subfamilies has already been studied with promising results [107]. Despite not having any effect on a typical and classical PKC (cPKC- α and - β), coleon U (**48**) was a potent and selective activator of novel PKC (nPKC- δ and - ϵ) [107]. Its structure is easily degraded by oxidation, forming a coleon-U-quinone (**107**) that also possesses cytotoxic effects [106].

Coleon C (**49**), found in *P. edulis*, was investigated for its anti-tumoral activity against several cell lines, such as 95-D, A375, HeLa, A431, MKN45, BEL7402, LoVo and HL60. Although with demonstrated activity in all of those, its effects seem to be more noticeable specially in human acute myeloid leukemia cells, human melanoma and gastric cancer cells [45]. Acute toxicity study was also performed on C57BL/6 mice through intraperitoneal injection, and an LD₅₀ of 1496 $\pm$ 150 mg/kg was recorded. Additionally, its effect on a Lewis lung cancer model was also assessed and remarkable results were recorded, with a tumor size decrease in 48.9 $\pm$ 14.3% [45]. It is also referred that coleon C (**49**) induces cellular death through apoptosis [45].

Abietic acid (**144**) was isolated from *P. wightii* (or *P. wel-witschii*) and its cytotoxicity was studied against cervical cancer cells (HeLa) using an MTT procedure followed by propidium iodide staining, in order to identify signs of apoptosis [109]. Other studies also seem to indicate that this abietane produces a dose-dependent inhibition on the growth of tumoral cells [110].

Taxoquinone or 7 β -hydroxyroyleanone (**118**) is an abietane diterpenoid isolated from *P. punctatus* that demonstrated anticancer potential by inhibiting the 20S human proteasome with an IC₅₀ value of 8.2 $\pm$ 2.4 μ g/ μ L [111].

P. barbatus has allowed the isolation for the first time of dehydroabietane (**5**) (often called abietatriene), taxodione (**6**) and, 20-deoxocarnosol (**9**), found in the aerial part of this plant. Their cytotoxicity was assessed on MRC-5 cell lines, with high toxicity of dehydroabietane (**5**), and taxodione (**6**) [104]. 20-Deoxocarnosol (**9**), on the other hand, has demonstrated activity on ovarian and breast cancer cell lines - A2780 and HBL-100, respectively [112]. It is also reported for targeting several multiple signaling pathways such as the 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) pathway [103].

Present in high quantities, *P. ecklonii*, allows the isolation of the abietane diterpenoid parvifloron D (**106**) [2 α -(4-hydroxy)-benzoyloxy-11-hydroxy- 5, 7, 9(11), 13-abietatetraen-12-one], which displayed a high cytotoxic profile, and was able to kill cells with the overexpression of P-glycoprotein. This protein is known for its role in compromising clinical efficacy in many anti-tumoral drugs (such as the microtubule-targeting agent, paclitaxel) due to its ability of creating multidrug resistance mechanisms, so it is important to discover new compounds that are able to evade this mechanism [89]. The diterpenes parvifloron F (**44**) and sugiol (**29**) were also isolated from this plant [52]. Recently, the total synthesis of parvifloron F (**44**) was accomplished and its cytotoxic properties assessed in several human tumoral cancer cell lines such as lung carcinoma A549, epidermoid carcinoma of the nasopharynx KB and its resistant counterpart KB-vin (overexpressing P-glycoprotein), triple-negative breast cancer MDA-MB231 and breast cancer MCF-7. This diterpene showed a consistent broad spectrum of anti-proliferative activity, with IC₅₀ ranging from 4.49-4.99 μ M. The results suggested that the oxidation level of the abietane ring appears to be important for the selective anti-proliferative effects of the compound. Also, the ester moiety of parvifloron F (**44**) did not affect the anti-proliferative activity against the tested cell lines [113]. Both compounds (parviflorons D and F (**106**, **44**)) were cytotoxic against vero cell lines, although parvifloron F was found to be the most cytotoxic component amongst those two [50].

Also, this abietane is unable to induce cell death in tumorous cells by inhibiting the anti-apoptotic proteins BCL-2 and Bcl-X_L, but rather triggering a different pathway that surpasses the mitochondrial permeability [89].

Studies indicated that its toxicity was evaluated in HL-60 cell lines, with an observed toxicity similar to the cytotoxic drug used, etoposide [89], and caused a faster and greater apoptotic effect on human leukemia cells than taxodone [54]. In addition, regarding its cell death mechanism, this diterpene induced cell death through the activation of the caspase-dependent pathway, with great activation on the initiator caspase-9 [89].

All compounds herein stated, regardless of cytotoxicity, are presented below, in Table 2.

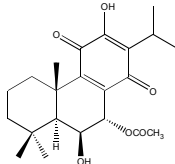
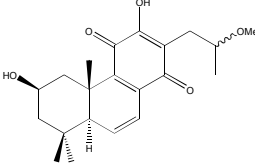
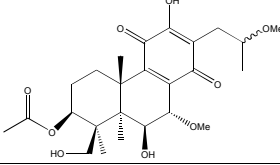
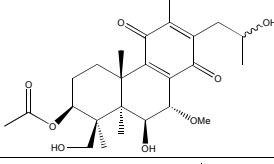
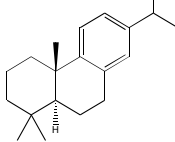
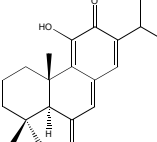
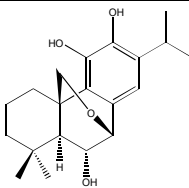
7. CELL DEATH MECHANISMS AND MOLECULAR TARGETS

Overall, there are not many reported researches regarding the study of *Plectranthus*-derived abietanes cell death mechanisms.

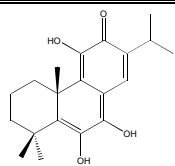
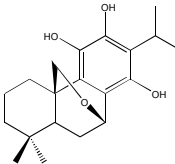
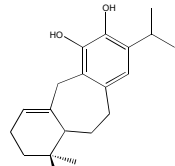
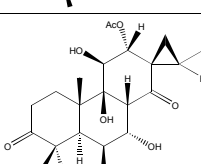
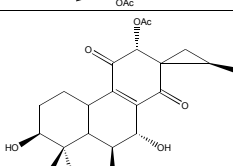
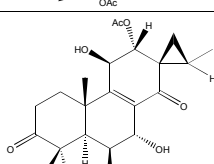
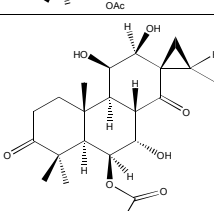
Altogether, it appears that the majority of the compounds tested for their effect on cell death-involved targets, are capable of inducing cell death through apoptotic mechanisms, namely, through the induction of the mitochondrial or intrinsic caspase-dependent apoptotic cascade. Both 6, 7-dehydroxyroyleanone (**6**), taxodione (**7**), ferruginol (**8**), abietic acid (**21**), coleon C (**20**), and parvifloron D (**24**) are examples of such case [45, 109]. Taxodione (**7**) and ferruginol (**8**) are implied in the clavation of caspase-3 [42].

On the other hand, sugiol (**1**) and 7-ketoroyleanone (**5**) were both active specially on human DNA topoisomerases I [98]. 6, 7-dehydroxyroyleanone (**6**) and parvifloron D (**24**) were both capable of killing cells overexpressing P-glycoprotein, although none of them target microtubules [54, 78]. Parvifloron D (**24**) inhibited the

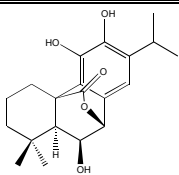
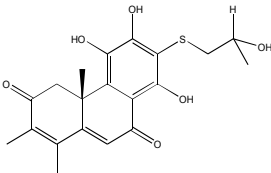
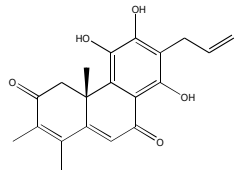
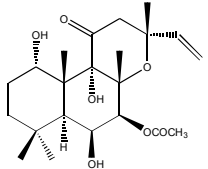
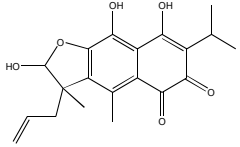
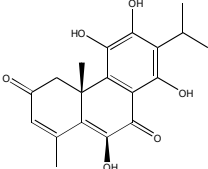
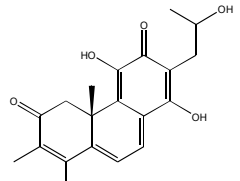
Table 2. Chemical structure of *Plectranthus*-derived natural occurring diterpenes.

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
7 α -Acetoxy-6 β -hydroxy-royleanone (1)	
Plectranthroyleanone A (2)	
Plectranthroyleanone B (3)	
Plectranthroyleanone C (4)	
Dehydro-abietane or abietatriene (5)	
Taxodione (6)	
6 α , 11, 12, -trihydroxy-7 β , 20-epoxy-8, 11, 13-abietatriene (7)	

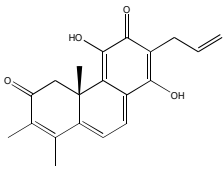
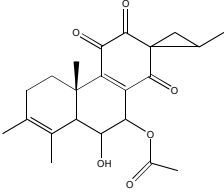
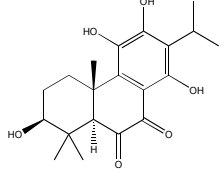
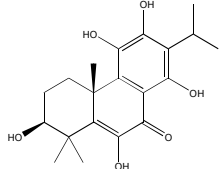
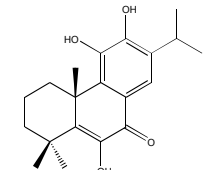
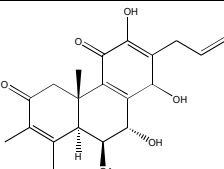
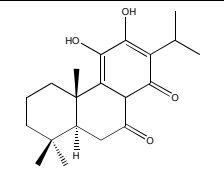
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
5, 6-didehydro-7-hydroxy-taxodone (8)	
20-Deoxocarnosol (9)	
Barbatusol (10)	
Cyclobutatusine (11)	
3β-hydroxy-3-deoxybarbatusin (12)	
Barbatusin (13)	
7β-acetil-12-desacetoxi-ciclobutatusine (14)	

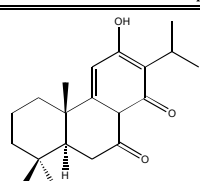
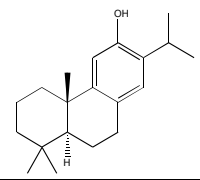
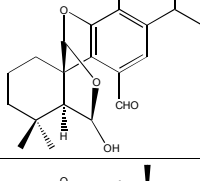
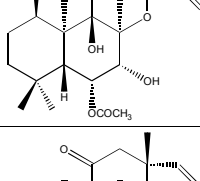
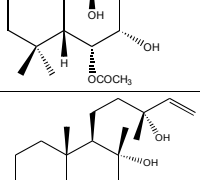
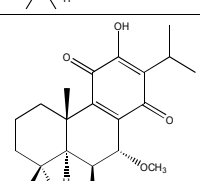
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
6 β -hydroxicarnosol (15)	
Plectrinone A (16)	
Plectrinone B (17)	
Forskolin (18)	
Coleon A (19)	
Coleon B (20)	
Coleon E (21)	

(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
Coleon F (22)	
Coleon O (23)	
Coleon T (24)	
Coleon S (25)	
14-deoxycoleon U (26)	
Plectranthone J (27)	
Demethylcryptojaponol or 11-hydroxysugiol (28)	

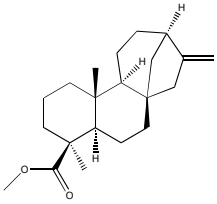
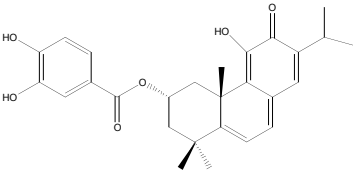
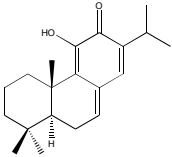
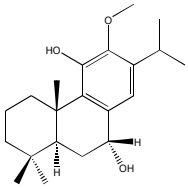
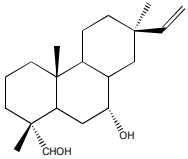
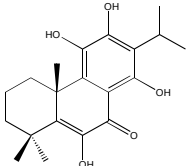
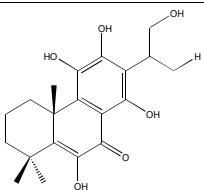
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
Sugiol (29)	
Ferruginol (30)	
Cariocal (31)	
Isoforskolin (32)	
1-deoxyforskolin (33)	
13-epi-sclareol (34)	
6β-hydroxy-7α-methoxyroyleanone (35)	

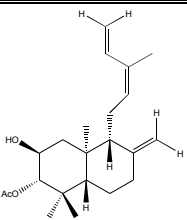
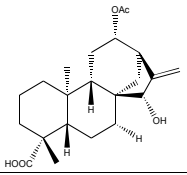
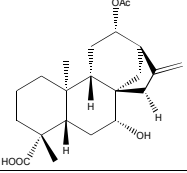
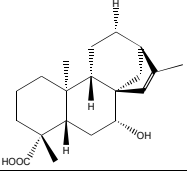
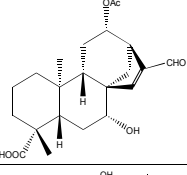
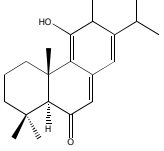
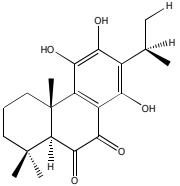
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
6, 7-Dehydroxyoleanone (36)	
6β, 7α-dihydroxyroyleanone (37)	
Coleon M (38)	
Coleon N (39)	
Coleon P (40)	
Coleon Q (41)	
Coleon R (42)	

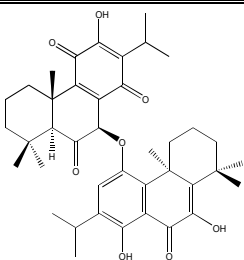
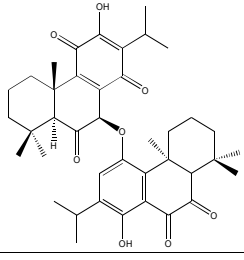
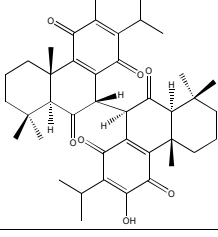
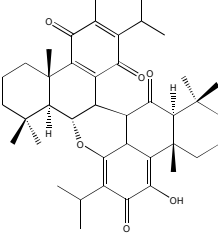
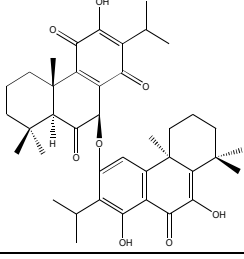
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
Kaurenic acid (43)	
Parvifloron F (44)	
11-Hydroxy-12-oxo-7, 9(11), 13-abietatriene (45)	
7 α , 11-dihydroxy-12-methoxy-8, 11, 13-abietatriene (46)	
7 α , 18-dihydroxy-isopimara-8(14), 15-diene (47)	
Coleon U (48)	
Coleon C (49)	

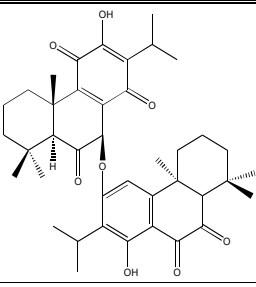
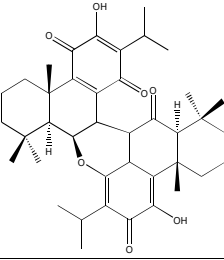
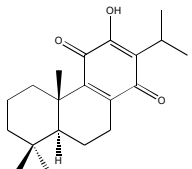
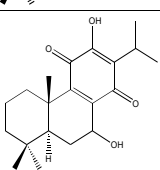
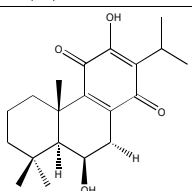
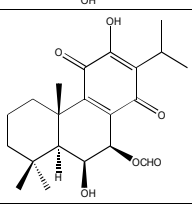
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
ent-3 β -acetoxylabda-8(17), 12Z, 14-trien-2 α -ol (50)	
ent-12 β -acetoxylabda-15 β -hydroxykaur-16-en-19-oic acid (51)	
ent-12 β -acetoxylabda-7 β -hydroxykaur-16-en-19-oic acid (52)	
ent-7 β -hydroxykaur-15-en-19-oic acid (53)	
ent-12 β -Acetoxylabda-17-oxokaur-15-en-19-oic acid (54)	
14-hydroxytaxodione (55)	
Coleon V (56)	

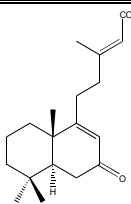
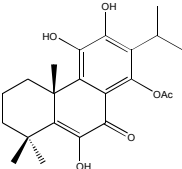
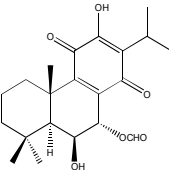
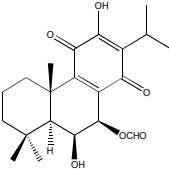
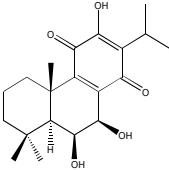
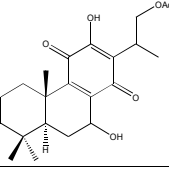
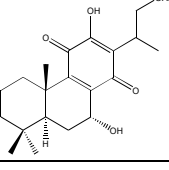
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
Grandidone A (57)	
Grandidone B (58)	
Grandidone C (59)	
Grandidone D (60)	
7-Epigrandidone A (61)	

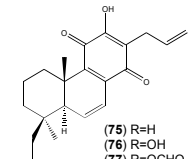
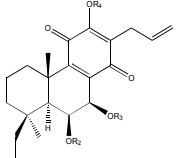
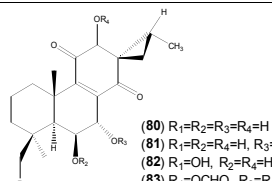
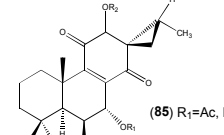
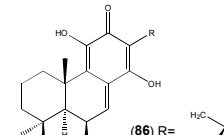
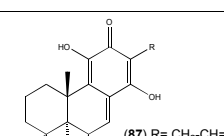
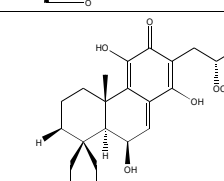
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
7-Epigrandidone B (62)	
7-Epigrandidone D (63)	
Royleanone (64)	
Horminone (65)	
6β-hydroxyroyleanone (66)	
7β-formyloxy-6β-hydroxyroyleanone (67)	

(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
Rhinocerotin acid (68)	
14-O-acetylcoleon U (69)	
7 α -formyloxy-6 β -hydroxyroyleanone or 7 α -formyloxy-6, 12-dihydroxy-abieta-8, 12-diene-11, 14-dione (70)	
7 β -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone or 7 α -acetoxy-6, 12-dihydroxy-abieta-8, 12-diene-11, 14-dione (71)	
6 β , 7 β -dihydroxy-royleanone (72)	
16-acetoxyhorminone (73)	
16-acetoxy-7 α -hydroxyroyleanone (74)	

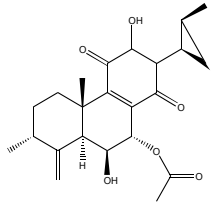
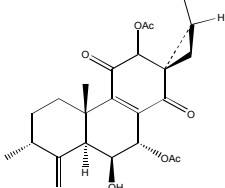
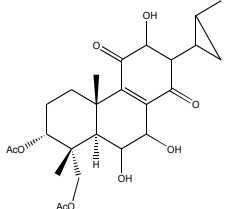
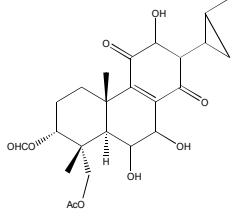
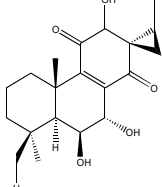
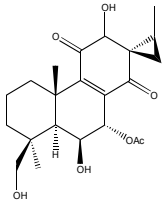
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
Lanugones A (75) Lanugone B (76) Lanugone C (77)	 (75) R=H (76) R=OH (77) R=OCHO
Lanugones D (78) Lanugone E (79)	 (78) R₁=CHO, R₂=R₃=R₄=H (79) R₁=R₂=R₄=H, R₃=C₂H₅
Lanugones F (80) Lanugone G (81) Lanugone H (82) Lanugone I (83) Lanugone J (84)	 (80) R₁=R₂=R₃=R₄=H (81) R₁=R₂=R₄=H, R₃=CHO (82) R₁=OH, R₂=R₄=H, R₃=CHO (83) R₁=OCHO, R₂=R₄=H, R₃=CHO (84) R₁=OCHO, R₂=R₄=Ac, R₃=CHO
Lanugones K (85)	 (85) R₁=Ac, R₂=H
Lanugone L (86)	 (86) R=
Lanugone M (87)	 (87) R= CH₂-CH=CH₂
Lanugone N (88)	

(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
Lanugone O (89)	
Lanugone P (90)	
Lanugone Q (91)	
Lanugone R (92)	
Lanugone S (83)	
(15S)-Coleon C (94)	
(15S)-Coleon D (95)	

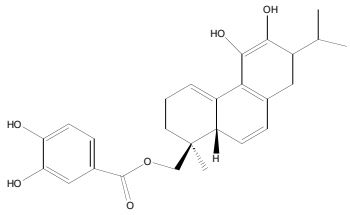
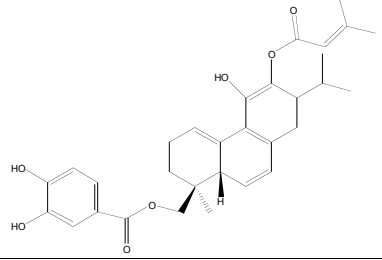
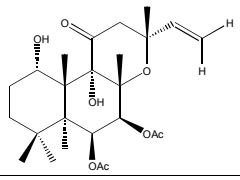
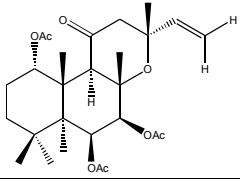
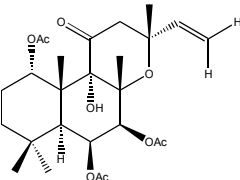
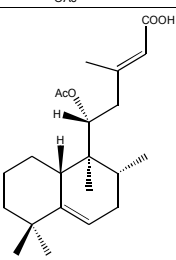
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
Coleon G (96)	
Coleon J (97)	
Coleon Y (98)	
3-O-desacetyl-3-O-formyl-coleon Y (99)	
12-O-desacetyl-coleon Q or 15-epilanugon F (100)	
7-O-acetyl-12-O-desacetyl-19-hydroxy-coleon Q (101)	

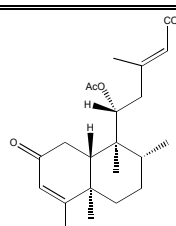
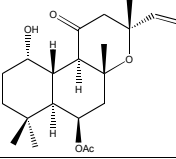
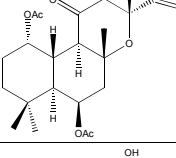
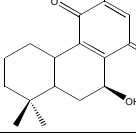
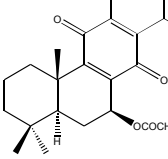
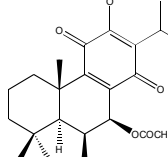
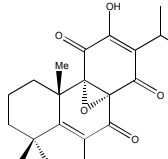
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
18-acetoxy-12-O-desacetyl-coleone Q (102)	
bis(abeo)-royleanone (103)	
di-abeo-7α-methoxy-royleanone (104)	
6β, 7α-dihydroxy(allyl)royleanone (105)	
Parvifloron D (106)	
Coleon-U-quinone (107)	
Parviflorone E (108)	

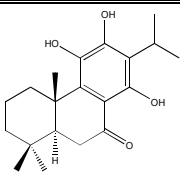
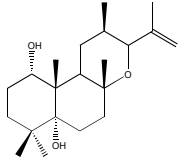
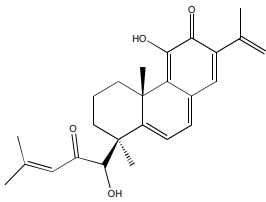
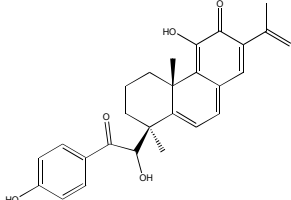
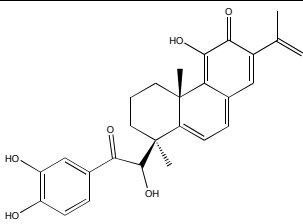
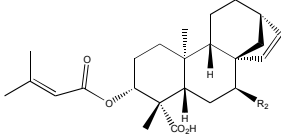
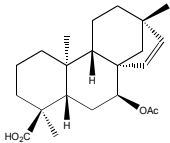
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
Plectranthol A (109)	
Plectranthol B (110)	
6-O-acetylforskolin (111)	
1, 6-di-O-acetyl-9-deoxyforskolin (112)	
1, 6-di-O-acetylforskolin (113)	
11R*-acetoxymalima-5, 13E-dien-15-oic acid (114)	

(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
Plectromatin A (115)	
Plectromatin B (116)	
Plectromatin C (117)	
Taxoquinone or 7β-hydroxy-royleanone (118)	
7β-acetoxy-royleanone (119)	
7β-acetoxy-6β-hydroxy-12-O-methyl- royleanone (120)	
8α, 9α-epoxycoleon-U-quinone (121)	

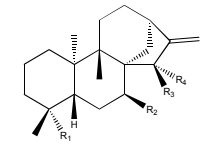
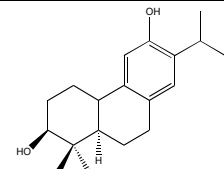
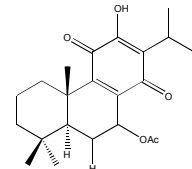
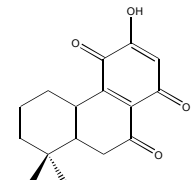
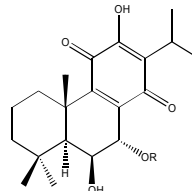
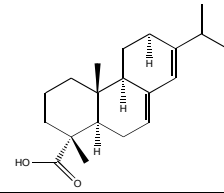
(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
Demethylinuroleanol (122)	
1 α , 5 α -dihydroxymanoyl oxide (123)	
11-hydroxy-19-(methyl-buten-2-oyloxy)-abieta-5, 7, 9(11), 13-tetraene-12-one (124)	
11-hydroxy-19-(4-hydroxy-benzoyloxy)-abieta-5, 7, 9(11), 13-tetraene-12-one (125)	
11-hydroxy-19-(3, 4-dihydroxybenzoyloxy)-abieta-5, 7, 9(11), 13-tetraene-12-one (126)	
ent-3 β -(3-methyl-2-butenoyloxy)-15-beyeren-19-oic acid (127)	
ent-7 α -acetoxy-15-beyeren-18-oic acid (128)	

(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
7 α -formyloxy-6 β -hydroxyroyleanone (129)	
Sanguinone A (130)	
16-O-acetylcoleon D (131)	
Parvifloron A (132)	
Parvifloron B (133)	
Parvifloron G (134)	
Parvifloron H (135)	

(Table 2) Contd....

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
ent-16-kauren-19-ol (136) ent-16-kauren-19-oic (137) xylopic acid (138) xylopinic acid (139)	 (136) $R_1=CH_2OH$, $R_2=R_3=R_4=H$ (137) $R_1=COOH$, $R_2=R_3=R_4=H$ (138) $R_1=COOH$, $R_2=R_3=H$, $R_4=OAc$ (139) $R_1=COOH$, $R_2=OAc$, $R_3=R_4=O$
Hinokiol (140)	
7 α -acetoxy-royleanone (141)	
7-oxoroyleanone or 7-ketoroyleanone (142)	
7 α -acyloxy-6 β -Hydroxyroyleanone (143)	 R = fatty acid chain
Abietic acid (144)	

anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-X_L, and activated of the caspase-dependent pathway, with great activation on the initiator caspase-9 [89].

As such, the deregulation in the apoptotic pathways can add up to the development of resistance to cancer therapy [114]. In this way, the apoptotic pathways have become interesting targets when

developing or discovering new compounds with anticancer potential [114]. Thus, and since the best-characterized form of programmed cell death - apoptosis - requires the activation of enzymes such as caspase proteases, these are consequently implied as key elements in cancer therapy [115].

Targets as PKC are also studied for some abietanes diterpenes, such as Coleon U (10), which were found to be selective on the activation of both nPKC- δ and - ϵ [107].

Overall abietane diterpenes induce apoptosis mainly via the intrinsic pathway [116]. Their action is mainly seen through the release of cytochrome c from mitochondria to cytosol, accompanied by the activation of the effector caspase -3, and a decreased level of the anti-apoptotic protein Bcl-2 [89, 103, 116]. Nevertheless, studies on the cellular targets of abietanes are still limited, and new information is required to better understand their overall behavior on cells.

CONCLUSION

For this review, previous reviews regarding the chemical composition of the *Plectranthus* genus were taken into consideration. This genus covers a diverse number of species, but many of them have not yet been studied for their chemical composition and/or bioactivity. Furthermore, although *Plectranthus* has a variety of bioactive compounds, for the purpose of this review, only diterpenes of the abietane type with proven cytotoxic activity or anticancer potential were taken into consideration. In addition, dimeric structures of abietane diterpenes were not regarded.

Ultimately, this review makes clear that abietane diterpenes are a prevalent class of secondary metabolites with a high value regarding their cytotoxic potential. When analyzing the overall cytotoxic profile of the described abietane-type diterpenes, a family of compounds tends to stand out from others - the royleanones. Even though some studies regarding their mechanisms of cell death have been performed, there is still no mechanism of cell death directly attributed to this class. Nevertheless, it becomes clear that there is a tendency to conclude that these diterpenes may cause an apoptotic mechanism in the cells.

It is also known that there are many others as *Plectranthus*-derived abietane diterpenes, with a proven bioactivity. Despite their biological effects, some are not featured in this review, due to the fact that their anticancer potential has not yet been proven or they have proven to be non-cytotoxic. Also, interestingly, several abietane-type diterpenes have been studied for their antimicrobial properties, and as a result, are regarded as potential antimicrobial agents. However, some of them have not yet been studied for their cytotoxicity.

Interestingly, not many studies refer to the selectivity of these compounds, with the exception of 6, 7-dehydroroleanone and coleon U, which exhibited a selective cytotoxic profile to some cancer cell lines, without exhibiting toxic effects on normal cells.

Nevertheless, there is still the need to further study structure-activity relationships, in order to relate the ability of inducing cellular toxicity with their chemical structure.

LIST OF ABBREVIATIONS

DNA	=	Deoxyribonucleic acid
DPPH	=	2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FDA	=	Food and Drug Administration
IC ₅₀	=	Half maximal inhibitory concentration
LD ₅₀	=	Half maximal lethal dose
MDR	=	Multidrug resistance
MRSA	=	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
P-gp	=	P-glycoprotein
PKC	=	Protein Kinase C

VRE = Vancomycin-resistant *Enterococcus*

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none.

REFERENCES

- [1] Amin A, Gali-Muhtasib H, Ocker M, Schneider-Stock R. Overview of major classes of plant-derived anticancer drugs 2009; 5: 1-11.
- [2] Gali-Muhtasib H, Hmadi R, Karez M, Tohme R, Darwiche N. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis 2015; 20: 1531-62.
- [3] Greenwell M, Rahman PKSM. Medicinal Plants. Int J Pharm Sci Res 2015; 6(10): 4103-12.
- [4] What Is Cancer? - National Cancer Institute [homepage on the Internet]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer> 2015 [cited 2017 Dec 20].
- [5] Plenderleith IH. Treating the treatment: toxicity of cancer chemotherapy 1990; 36: 1827-30.
- [6] Tewary P, Gunatillaka AAL, Sayers TJ. Using natural products to promote caspase-8-dependent cancer cell death 2016; 1-9.
- [7] Rice LJ, Brits GJ, Potgieter CJ, Van Staden J. Plectranthus: A plant for the future? 2011; 77: 947-59.
- [8] Lukhoba CW, Simmonds MSJ, Paton AJ. Plectranthus : A review of ethnobotanical uses 2006; 103: 1-24.
- [9] Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy 2011; 4: 687-99.
- [10] Cragg GM, Newman DJ. Plants as a source of anti-cancer agents 2005; 100: 72-9.
- [11] Murthy PS, Ramalakshmi K, Srinivas P. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles 2009; 114: 1014-8.
- [12] Thoppil RJ, Bishayee A. Terpenoids as potential chemopreventive and therapeutic agents in liver cancer 2011; 3: 228-49.
- [13] Sandjo LP, Kuete V. Diterpenoids from the Medicinal Plants of Africa. Med Plant Res 2013; 105-33.
- [14] Rijo P. Phytochemical Study And Biological Activities Of Diterpenes And Derivatives From *Plectranthus* Species 2011.
- [15] Smanski MJ, Peterson RM, Shen B. Platensimycin and Platencin Biosynthesis in *Streptomyces platensis*, Showcasing Discovery and Characterization of Novel Bacterial Diterpene Synthases 2012; 515: 163-86.
- [16] Ludwiczuk A, Skalička-Woźniak K, Georgiev MI. Terpenoids. Pharmacognosy 2017; 233-66.
- [17] Hao DC, Gu X-J, Xiao PG, Hao DC, Gu X-J, Xiao PG. Phytochemical and biological research of *Salvia* medicinal resources. Med Plants 2015; 587-639.
- [18] Muniyandi K, George E, Mudili V, Kalagatur NK, Anthuvan AJ, Krishna K, et al. Antioxidant and anticancer activities of *Plectranthus stocksii* Hook f leaf and stem extracts 2017; 51: 63-73.
- [19] Julia Wellsow, Rene'e J Grayer, Nigel C Veitch, Tetsuo Kokubun, Roberto Lelli, Geoffrey C Kite, et al. Insect-antifeedant and antibacterial activity of diterpenoids from species of *Plectranthus* 2006; 67: 1818-25.
- [20] ALDRED E, Buck C, Vall K, Aldred EM, Buck C, Vall K. Terpenes. Pharmacology 2009; 167-74.
- [21] Rijo P, Simões MF, Duarte A, Rodriguez B. Isopimarane diterpenoids from *Aeollanthus rydingianus* and their antimicrobial activity 2009; 70: 1161-5.
- [22] Waldia S, Joshi BC, Pathak U, Joshi MC. The genus *Plectranthus* in India and its chemistry 2011; 8: 244-52.
- [23] Abdel-Mogib M, Albar HA, Batterjee SM. Chemistry of the genus *Plectranthus* 2002; 7: 271-301.
- [24] Islam MT. Diterpenes and Their Derivatives as Potential Anticancer Agents 2017; 31: 691-712.
- [25] Podolski-Renić A, Andelković T, Banković J, Tanić N, Ruždijić S, Pešić M. The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines 2011; 65: 345-53.

- [26] National Cancer Institute [homepage on the Internet].n.d. Available from: <https://www.cancer.gov/> [cited 2018 Mar 28];
- [27] U S Food and Drug Administration [homepage on the Internet].n.d. Available from: <https://www.fda.gov/> [cited 2018 Mar 28];
- [28] Rijo P, Matias D, Fernandes AS, Simões MF, Nicolai M, Reis CP. Antimicrobial plant extracts encapsulated into polymeric beads for potential application on the skin 2014; 6: 479-90.
- [29] Rasikari H. Phytochemistry and arthropod bioactivity of Australian Lamiaceae 2007.
- [30] EN N, Marçalo J, Garcia C, Reis C, Teodósio C, Oliveira C, *et al.* Biological activity screening of seven Plectranthus species Pesquisa de actividade biológica de sete espécies de Plectranthus 2017; 14: 95-108.
- [31] Matias D, Nicolai M, Costa J, Saraiva N, Fernandes AS, Simões MF, *et al.* Cytotoxicity screening of Plectranthus spp extracts and individual components in MDA-MB-231 cells 2015; 238: S240.
- [32] Matias D, Pereira F, Nicolai M, Roberto A, Saraiva N, Fernandes A, *et al.* Abietane diterpenes from Plectranthus madagascariensis: A cytotoxicity screening 2014; 80: P11.152.
- [33] Yulianto W, Andarwulan N, Giriwono PE, Pamungkas J. HPLC-based metabolomics to identify cytotoxic compounds from Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng against human breast cancer MCF-7Cells 2016; 1039: 28-34.
- [34] Nzogong RT, Nganou BK, Tendonkeu AT, Awouafack MD, Tene M, Ito T, *et al.* Three New Abietane-Type Diterpenoids from Plectranthus africanus and Their Antibacterial Activities 2018; 84: 59-64.
- [35] Amina M, Alam P, Parvez MK, Al-Musayeb NM, Al-Hwaity SA, Al-Rashidi NS, *et al.* Isolation and validated HPTLC analysis of four cytotoxic compounds, including a new sesquiterpene from aerial parts of Plectranthus cylindraceus 2018; 32: 804-9.
- [36] Uma M, Jothinayaki S, Kumaravel S, Kalaiselvi P. Determination of Bioactive Components of Plectranthus amboinicus Lour by GC-MS Analysis 2011; 4: 66-9.
- [37] Mothana R, Al-Said M, Al-Musayeb N, Gamal A, Al-Massarani S, Al-Rehaily A, *et al.* In Vitro Antiprotzoal Activity of Abietane Diterpenoids Isolated from Plectranthus barbatus Andr 2014; 15: 8360-71.
- [38] Roberto L de Albuquerque, Maria R Kentopff, Maria Iracema L Machado, Matos FJ de A. Diterpenos tipo abietano isolados de Plectranthus barbatus 2007; 30: 1882-86.
- [39] Alasbahi RH, Melzig MF. Plectranthus barbatus: A review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology - Part 1. Planta Med 2010; 76(7): 653-61.
- [40] Schultz C, Bossolani MP, Torres LMB, Lima-Landman MTR, Lapa AJ, Souccar C. Inhibition of the gastric H⁺K⁺-ATPase by plectrinone A, a diterpenoid isolated from Plectranthus barbatus Andrews 2007; 111: 1-7.
- [41] Gelmini F, Squillace P, Testa C, Sparacino AC, Angioletti S, Beretta G. GC-MS characterisation and biological activity of essential oils from different vegetative organs of Plectranthus barbatus and Plectranthus caninus cultivated in north Italy 2015; 29: 993-8.
- [42] Tayarani-Najaran Z, Mousavi SH, Tajfard F, Asili J, Soltani S, Hatampour M, *et al.* Cytotoxic and apoptogenic properties of three isolated diterpenoids from Salvia chorassanica through bioassay-guided fractionation 2013; 57: 346-51.
- [43] Saeed MEM, Meyer M, Hussein A, Efferth T. Cytotoxicity of South-African medicinal plants towards sensitive and multidrug-resistant cancer cells 2016; 209-3.
- [44] Syamasundar KV, Vinodh G, Srinivas KVNS, Srinivasulu B. A New Abietane Diterpenoid from Plectranthus bishopianus Benth 2012; 95: 643-46.
- [45] Xing X, Wu H, Wang X, Huang Y, Li Q, Li C, *et al.* Inhibition of tumor cell proliferation by Coleon C 2008; 28: 238-45.
- [46] Tadesse S, Mazumder A, Bucar F, Veeresham C, Asres K. Chemical Composition and Biological Activities of the Essential Oil of Plectranthus caninus Roth 2011; 3: 1-7.
- [47] Arihara S, Rüedi P, Eugster CH. Diterpenoide Drüsenfarbstoffe: Coleone S und T aus Plectranthus caninus R OTH (Labiatae) , ein neues Diosphenol/ trans -A/B-6,7-Diketon-Paar aus der Abietanreihe 1977; 60: 1443-47.
- [48] Stavri M, Gibbons S. Antibacterial constituents from Plectranthus ciliatus 2007; 73: P_158.
- [49] Yoshizaki F, Rüedi P, Eugster CH. Diterpenoide Drüsenfarbstoffe aus Labiaten: 11 Coleone und Royleanone aus Coleus carnosus H ASSK 1979; 62: 2754-62.
- [50] Nyila MA, Leonard CM, Hussein AA, Lall N. Bioactivities of Plectranthus ecklonii constituents 2009; 4: 1177-80.
- [51] Van Zyl RL, Khan F, Edwards TJ, Drewes SE. Antiplasmodial activities of some abietane diterpenes from the leaves of five Plectranthus species 2008; 104: 62-4.
- [52] Rijo P, Faustino C, Simões MF. Antimicrobial natural products from Plectranthus plants 2013; Vol. 2
- [53] Amoa Onguéné P, Ntie-Kang F, Lifongo LL, Ndom JC, Sippl W, Mbaze LM. The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part I: A pharmacological evaluation of alkaloids and terpenoids 2013; 12: 449.
- [54] Burmistrova O, Simões MF, Rijo P, Quintana J, Bermejo J, Estévez F. Antiproliferative Activity of Abietane Diterpenoids against Human Tumor Cells 2013; 76: 1413-23.
- [55] Figueiredo NL, de Aguiar SRMM, Falé PL, Ascensão L, Serralheiro MLM, Lino ARL. The inhibitory effect of Plectranthus barbatus and Plectranthus ecklonii leaves on the viability, glucosyl-transferase activity and biofilm formation of Streptococcus sobrinus and Streptococcus mutans 2010; 119: 664-8.
- [56] Rabe T, van Staden J. Screening of Plectranthus species for antibacterial activity 1998; 64: 62-5.
- [57] Dellar JE, Cole MD, Waterman PG. Antimicrobial abietane diterpenoids from Plectranthus elegans 1996; 41: 735-38.
- [58] González MA. Synthetic derivatives of aromatic abietane diterpenoids and their biological activities 2014; 87: 834-42.
- [59] Gaspar-marques C, Fa M, Labdane and Kaurane Diterpenoids from Plectranthus fruticosus 2003; 491-96.
- [60] Gaspar-Marques C, Simões MF, Rodríguez B. Further Labdane and Kaurane Diterpenoids and Other Constituents from Plectranthus fruticosus 2004; 67: 614-21.
- [61] Kubinová R, Švajdenka E, Schneiderová K, Hanáková Z, Dall'Acqua S, Farsa O. Polyphenols and diterpenoids from Plectranthus forsteri. Marginatus 2013; 49: 39-42.
- [62] Gaspar-Marques C, Rijo P, Simões MF, Duarte MA, Rodríguez B. Abietanes from Plectranthus grandidentatus and P hereroensis against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria 2006; 13: 267-71.
- [63] Ladeiras D, Monteiro CM, Pereira F, Reis CP, Afonso CA, Rijo P. Reactivity of Diterpenoid Quinones: Royleanones. Curr Pharm Des 2016; 22(12): 1682-714.
- [64] Teixeira AP, Batista O, Simões MF, *et al.* Abietane diterpenoids from Plectranthus grandidentatus 1997; 44: 325-27.
- [65] Marques CG, Pedro M, Simões MF, Nascimento MS, Pinto MM, Rodríguez B. Effect of Abietane Diterpenes from Plectranthus grandidentatus on the Growth of Human Cancer Cell Lines 2002; 68: 839-40.
- [66] Cerqueira F, Cordeiro-da-Silva A, Gaspar-Marques C, Simões F, Pinto MMM, Nascimento MSJ. Effect of Abietane Diterpenes From Plectranthus Grandidentatus on T- And B-Lymphocyte Proliferation - Journals - NCBI 2004; 12: 217-3.
- [67] Rijo P, Duarte A, Francisco AP, Semedo-Lemsaddek T, Simões MF, Patricia Rijo, *et al.* In vitro Antimicrobial Activity of Royleanone Derivatives Against Gram-Positive Bacterial Pathogens 2014; 28: 76-81.
- [68] Bernardes CES, Garcia C, Pereira F, Mota J, Pereira P, Cebola MJ, *et al.* Extraction Optimization and Structural and Thermal Characterization of the Antimicrobial Abietane 7α-Acetoxy-6β-hydroxyroyleanone 2018; 15: 1412-9.
- [69] Rijo P, Gaspar-Marques C, Simões MF, Jimeno ML, Rodríguez B. Further diterpenoids from Plectranthus ornatus and P grandidentatus 2007; 35: 215-.
- [70] Menon darsan b . Anti-inflammatory and cytotoxic activity of methanolic extract of Plectranthus hadiensis Stem 2011; 282: 275-82.
- [71] Mothana RAA, Jansen R, Gruenert R, Bednarski PJ, Lindequist U. Antimicrobial and cytotoxic abietane diterpenoids from the roots of Meriandra benghalensis (Roxb.) Benth. Pharmazie 2009; 64(9): 613-5.
- [72] Rijo P, Batista M, Matos M, Rocha H, Jesus S, Simões MF. Screening of antioxidant and antimicrobial activities on Plectranthus spp extracts 2012; 9: 225-35.
- [73] Menon DB, Gopalakrishnan VK. Terpenoids Isolated From the Shoot of Plectranthus hadiensis Induces Apoptosis in Human Colon

- Cancer Cells Via the Mitochondria-Dependent Pathway 2015; 67: 697-705.
- [74] Ferreira R, Candeias F, Simões F, Nascimento J, Cruz Morais J. Effects of hormone on liver mixed function mono-oxygenases and glutathione enzyme activities of Wistar Rat 1997; 58: 21-30.
- [75] Schmid JM, Rüedi P, Eugster CH. Diterpenoide Drüsenfarbstoffe aus Labiaten: 22 neue Coleone und Royleanone aus *Plectranthus lanuginosus* 1982; 65: 2136-63.
- [76] Kubínová R, Pořízková R, Navrátilová A, et al. Antimicrobial and enzyme inhibitory activities of the constituents of *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth. J Enzyme Inhib Med Chem 2014; 29(5): 749-52.
- [77] Ascensão L, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Schripsema J, Deans SG, et al. *Plectranthus madagascariensis*. Morphology of the Glandular Trichomes, Essential Oil Composition, and Its Biological Activity 1998; 159: 31-8.
- [78] Garcia C, Silva CO, Monteiro CM, Nicolai M, Ladeira D, Viana A, et al. Anticancer properties of the abietane diterpene 6,7-dehydroroyleanone obtained by optimized extraction 2018; 10.
- [79] Arukawa YN, Himizu NS, Himotohno KS, Akeda TT. Two New Diterpenoids from *Plectranthus nummularius* BRIQ 2001; 49: 1182-84.
- [80] Rijo P, Fernandes AS, Simões F, Pinheiro L. Evaluation of diterpenoids from *P. ornatus* as potential COX-1 inhibitors 2012.
- [81] Rijo P, Simões MF, Rodríguez B. Structural and spectral assignment of three forskolin-like diterpenoids isolated from *Plectranthus ornatus* 2005; 43: 595-98.
- [82] Hanson J. Diterpenoids 2004; 21: 312-20.
- [83] Rijo P, Gaspar-Marques C, Simões MF, Duarte A, del Carmen Apreda-Rojas M, Cano FH, et al. Neoclerodane and Labdane Diterpenoids from *Plectranthus ornatus* 2002; 65: 1387-90.
- [84] Abdissa N, Frese M, Sewald N. Antimicrobial Abietane-Type Diterpenoids from *Plectranthus punctatus* 2017; 22: 1919.
- [85] Simões MF, Rijo P, Duarte A, Barbosa D, Matias D, Delgado J, et al. Two new diterpenoids from *Plectranthus* species 2010; 3: 221-5.
- [86] Matloubi-Moghadam F, Rüedi P, Eugster CH. Drüsenfarbstoffe aus Labiaten: Identifizierung von 17 Abietanoiden aus *Plectranthus sanguineus* 1987; 70: 975-83.
- [87] Alder AC, Rüedi P, Eugster CH. Glandular pigments from tropical labiates: parviflorones from *Plectranthus strigosus* Benth 1984; 67: 1531-34.
- [88] Gaspar-Marques C, Simões MF, Valdeira ML, Rodríguez B. Terpenoids and phenolics from *Plectranthus strigosus*, bioactivity screening 2008; 22: 167-77.
- [89] Burmistrova O, Perdomo J, Simões MF, Rijo P, Quintana J, Estévez F. The abietane diterpenoid parvifloron D from *Plectranthus ecklonii* is a potent apoptotic inducer in human leukemia cells 2015; 22: 1009-6.
- [90] Rijo P, Fernandes AS, Simões F, Pinheiro L. Evaluation of diterpenoids from *P. ornatus* as potential COX-1 inhibitors 2012; 111-8.
- [91] Pereira M, Matias D, Pereira F, Reis CP, Simões MF, Rijo P. Antimicrobial screening of *Plectranthus madagascariensis* and *P. neochilus* extract 2015; 12: 127-38.
- [92] Matias D, Simões MF, Reis C, Saraiva L, Rijo PBC. Natural products as lead protein kinase C modulators for cancer Therapy nd Slamenova D, Masterova I, Labaj J, Horvathova E, Kubala P, Jakubikova J, et al. Cytotoxic and DNA-Damaging Effects of Diterpenoid Quinones from the Roots of *Salvia officinalis* L on Colonic and Hepatic Human Cells Cultured in vitro 2004; 94: 282-90.
- [94] Rijo P, Simões MF, Francisco AP, Rojas R, Gilman RH, Vaisberg AJ, et al. Antimycobacterial Metabolites from *Plectranthus*: Royleanone Derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* Strains 2010; 7: 922-32.
- [95] Fong HHS, Farnsworth R. 7-O-methylhorminone and other cytotoxic diterpene quinones 1989; 571-75.
- [96] Areche C, Schmida-Hirschmann G, Theoduloz C, Rodríguez JA. Gastroprotective effect and cytotoxicity of abietane diterpenes from the Chilean Lamiaceae *Sphaele chamaedryoides* (Balbis) Briq. J Pharm Pharmacol 2009; 61(12): 1689-97.
- [97] Córdova I, León LG, León F, San Andrés L, Luis JG, Padrón JM. Synthesis and antiproliferative activity of novel sugiol β -amino alcohol analogs 2006; 41: 1327-32.
- [98] Fronza M, Lamy E, Günther S, Heinzmann B, Laufer S, Merfort I. Abietane diterpenes induce cytotoxic effects in human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 through different modes of action 2012; 78: 107-9.
- [99] Fronza M, Murillo R, S'lusarczyk S, Adams M, Hamburger M, Heinzmann B, et al. In vitro cytotoxic activity of abietane diterpenes from *Peltodon longipes* as well as *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia sahendica* 2011; 19: 4876-81.
- [100] Kusuma CM, Kokai-Kun JF. Comparison of four methods for determining lysostaphin susceptibility of various strains of *Staphylococcus aureus* 2005; 49: 3256-63.
- [101] Choudhary M, Hussain A, Ali Z, Adhikari A, Sattar S, Ayatollahi S, et al. Diterpenoids Including a Novel Dimeric Conjugate from *Salvia leriæfolia* 2012; 78: 269-75.
- [102] Moujir L, Gutiérrez-Navarro AM, San Andrés L, Luis JG. Bioactive Diterpenoids Isolated from *Salvia mellifera* 1996; 10: 172-74.
- [103] Akaberi M, Mehri S, Iranshahi M. Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from *Salvia* species 2015; 100: 118-32.
- [104] Alasbahi RH, Melzig MF. *Plectranthus barbatus*: A review of phytochemistry, ethnobotanical uses and pharmacology - Part I. Planta Med 2010; 76(7): 653-61.
- [105] Machumi F, Samoylenko V, Yenesew A, Derese S, Midwi JO, Wiggers FT, et al. Antimicrobial and antiparasitic abietane diterpenoids from the roots of *Clerodendrum eriophyllum* 2010; 5: 853-58.
- [106] Rahman A. Studies in natural products chemistry Volume 50 nd Coutinho I, Simões MF, Côte-Real M, et al. Selective activation of protein kinase C-delta and -epsilon by 6,11,12,14-tetrahydroxy-abieta-5,8,11,13-tetraene-7-one (coleon U) 2009; 78: 449-59.
- [108] Mei SX, Jiang B, Niu XM, Li ML, Yang H, Na Z, et al. Abietane diterpenoids from *Coleus xanthanthus* 2002; 65: 633-37.
- [109] Ramnath MG, Thirugnanasampandan R, Mathusalini S, Mohan PS. Hepatoprotective and Cytotoxic Activities of Abietic Acid from *Isodon wightii* (Benth) H. Hara. Pharmacognosy Res 2016; 8(3): 206-8.
- [110] González MA, Correa-Royero J, Agudelo L, Mesa A, Betancur-Galvis L. Synthesis and biological evaluation of abietic acid derivatives 2009; 44: 2468-72.
- [111] Bajpai VK, Rather IA, Kang SC, Park YH. A diterpenoid taxoquinone from *Metasequoia glyptostroboides* with pharmacological potential 2016.
- [112] Guerrero IC, Andr??s LS, Le??n LG, Mach??n RP, Padr??n JM, Luis JG, et al. Abietane diterpenoids from *Salvia pachyphylla* and *S. clevelandii* with cytotoxic activity against human cancer cell lines 2006; 69: 1803-5.
- [113] Saito Y, Goto M, Nakagawa-Goto K. Total Synthesis of Antiproliferative Parvifloron F 2018; 20: 628-31.
- [114] Diaz L, Chiong M, Quest A, Lavandero S, Stutzin A. Mechanisms of cell death: molecular insights and therapeutic perspectives 2005; 12: 1449-56.
- [115] Tait SWG, Ichim G, Green DR. Die another way - non-apoptotic mechanisms of cell death 2014; 127.
- [116] Wiart C. Lead compounds from medicinal plants for the treatment of cancer 2013.

Anexo II: Espectro de ^{13}C -RMN do composto 7α -acetoxi- 6β -hidroxiroileanona

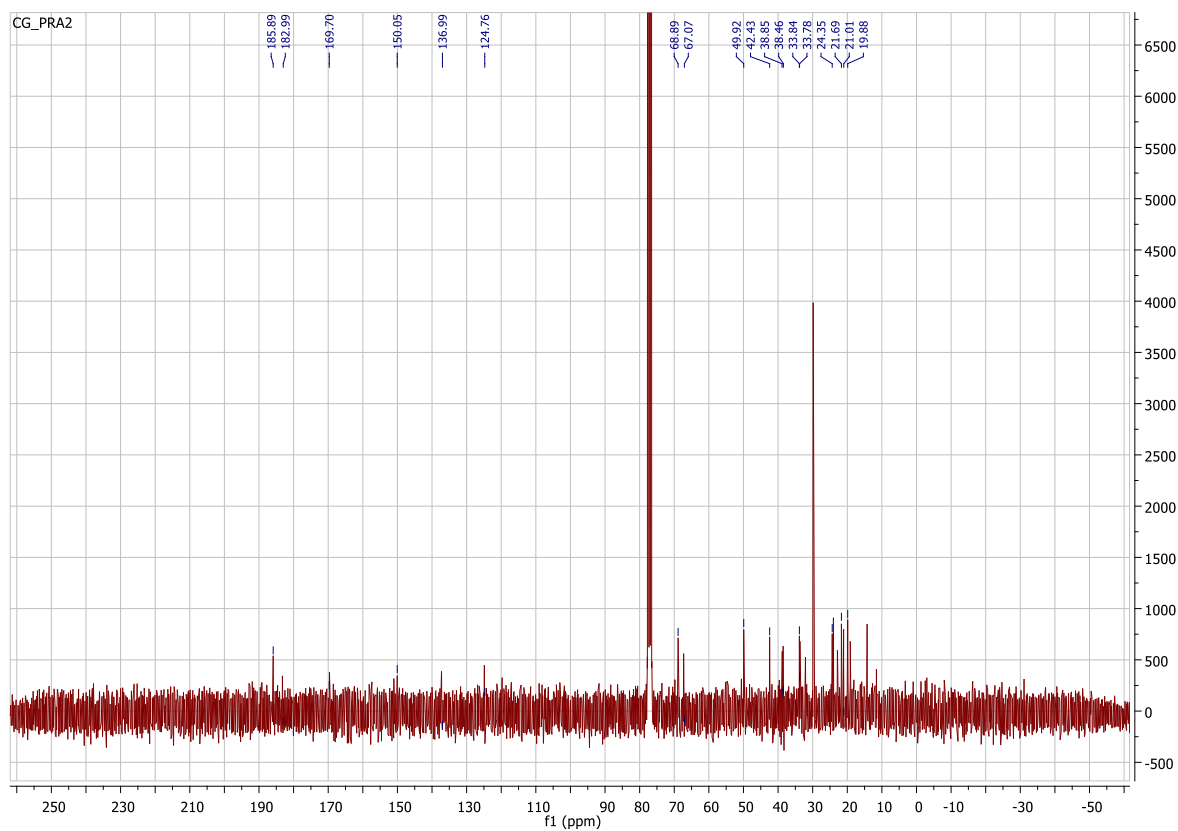


Figura 40- Espectro de ^{13}C -RMN do composto isolado da fração F2, 7α -acetoxi- 6β -hidroxiroileanona, após fracionamento do extrato de *P. hadiensis* (Ntungwe et al., 2018).