

CAROLINA ISABEL FAUSTINO PEREIRA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS
EXTRATOS DE *PLECTRANTHUS MUTABILIS*, *P.*
CILIATUS, *P. XEROPHILUS*, *P. CRASSUS* E *P. LUCIDUS***

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Dias Mendonça Rijo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2019

CAROLINA ISABEL FAUSTINO PEREIRA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS
EXTRATOS DE *PLECTRANTHUS MUTABILIS*, *P.*
CILIATUS, *P. XEROPHILUS*, *P. CRASSUS* E *P. LUCIDUS***

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: 42/2020, de 12 de Fevereiro de 2020, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente: Prof^ª. Doutora Mariana Reis

Orientadora: Prof^ª. Doutora Patrícia Dias Mendonça Rijo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2019

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades, se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Dalai Lama

Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito da unidade curricular de Projeto e, como tal, o meu primeiro agradecimento vai para a Professora Doutora Patrícia Dias Mendonça Rijo que, há três anos, me tem vindo a orientar com empenho e a incentivar à participação em eventos de grande importância para a investigação.

Agradeço à Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde (ECTS) da Universidade Lusófona, pelo reconhecimento do meu trajeto curricular e consequente atribuição da bolsa PADDIC (Programa de apoio ao desenvolvimento e divulgação da investigação científica), que me incentivou na realização deste projeto.

Agradeço à Professora Doutora Catarina Garcia e Professora Epole Ntungwe da ECTS, da Universidade Lusófona, por tornarem possível a realização deste trabalho e pela amizade.

Agradeço à Professora Doutora Lucília Saraiva do Laboratório de Microbiologia, do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto pela colaboração na realização de ensaios de citotoxicidade em células tumorais humanas.

Agradeço às minhas colegas e amigas Catarina Teodósio, Cláudia Oliveira e Raquel Ferreira, pelo companheirismo e amizade ao longo destes cinco anos e que levo para a vida.

Agradeço aos meus amigos de infância Mónica Luís, João Guisado, Ana Belchior, Guilherme Teixeira, Ana Soares e, namorado, Diogo Rosa por serem o meu escape sempre que os obstáculos pareciam intransponíveis.

E por último, mas não menos importante, agradeço a toda a minha família, em particular: país, Paula Oliveira e Jorge Oliveira, por serem os primeiros a acreditarem em mim e pelo apoio incondicional; avós, Isabel Ilhéu e Raul Ilhéu, por terem sido os meus pilares quando mais precisei; irmão, João Oliveira, pelo exemplo de vida que foi para mim e que, apesar de hoje estar apenas presente no meu coração, foi essencial para que eu me tornasse na pessoa que sou hoje e prima, Adriana Oliveira, pela disponibilidade para me aconselhar e ajudar sempre que precisei.

A todos expresso um enorme obrigada.

Produção Científica

Os resultados presentes nesta dissertação bem como outros trabalhos realizados encontram-se identificados abaixo.

Artigos científicos

- Ntungwe, E., Marçalo, J., Garcia, C., Reis, C., Teodósio, C., **Oliveira, C. I.**, Oliveira, C. F., Roberto, A. & Rijo, P. (2017). Biological activity screening of seven *Plectranthus* species. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 14(1), 95–108.

<https://doi.org/10.19277/bbr.14.1.153>.

- Ntungwe, E., Bessa, C., Garcia, C., Teodósio, C., **Oliveira, C.**, Oliveira, C., Andrade, J., Isca, V., Roberto, A., Saraiva, L. & Rijo, P. (2018). *7 α -Acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone* from *Plectranthus ramosior*: a screening study for anticancer lead molecules. *Planta medica*. Em submissão.

- Garcia, C., Teodósio, C., **Oliveira, C.**, Oliveira, C., Diaz-Lanza, A., Reis, C., Duarte, N. & Rijo, P. (2018). Naturally occurring *Plectranthus*-derived diterpenes with antitumoral activities. *Current Pharmaceutical Design*, Volume 24, Number 36, 2018, pp. 4207-4236(30). <https://doi.org/10.2174/1381612825666190115144241>.

- Macedo, A., Filipe, P., Thomé, N. G., Vieira, J., **Oliveira, C.**, Teodósio, C., Ferreira, R., Roque, L. & Fonte, P. (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>

Comunicações em painel nacionais

- **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 da Associação Nacional das Farmácias (ANF), 19 outubro, Lisboa, Portugal, 2018.

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

- C. Garcia, **C. Oliveira**, C.S. Oliveira, A. Roberto, C. Reis, M. Nicolai, P. Rijo, “*Determination of the antioxidante activity of medicinal plants extracts – a didactic approach*”; II Jornadas CBIOS, 12 outubro, Lisboa, Portugal, 2016.

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

Comunicações em painel internacionais

- Henrique Silva, Ntungwe Epole, 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 Ntungwe N, 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); 2nd Training School COST Action CM 1407, 18-20 setembro, Lisboa, Portugal, 2017.

Proceeding nacional

- C. Garcia, **C. Oliveira**, C.S. Oliveira, A. Roberto, C. Reis, M. Nicolai, P. Rijo, “*Determination of the antioxidante activity of medicinal plants extracts – a didactic approach*”, *Biomed Biopharm Res.*, 2016; (P9) 2 :, 273-290.

Proceeding internacional

- Epole Ntungwe N, 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 CM 1407, 21-22 setembro, Lisboa, Portugal, 2017.

Suplemento

- E. Ntungwe, J. Marçalo, C. Garcia, C. Reis, C. Teodósio, **C. Oliveira**, C. F. Oliveira, A. Roberto, P. Rijo, “*Biological activity screening of seven Plectranthus species:Anticancer lead molecule search*”, *Biomed Biopharm Res.*, 2017; (P5) 2:, 253-286. <https://doi.org/10.19277/bbr.14.2.168>.

Resumo

Neste trabalho foi avaliada a atividade biológica de cinco espécies do género *Plectranthus* (*P. mutabilis*, *P. lucidus*, *P. xerophilus*, *P. crassus* e *P. ciliatus*). As bioatividades testadas foram as atividades antioxidante, pelo método de DPPH, e antimicrobiana, pelo método de difusão em poços, e a toxicidade geral, pelo modelo de *Artemia salina* L.

O extrato de *P. mutabilis* apresentou o maior rendimento de extração (30,3%) e a atividade antioxidante mais elevada (46,14%). Demonstrou atividade antimicrobiana significativa contra *S. aureus* (17 mm) e moderada contra *C. albicans* (10 mm) pelo que, posteriormente, determinaram-se os valores da CMI (31,25 e 125 µg/mL, respetivamente), CMB e CMF (125 µg/mL), pelo método de microdiluição. Esta planta demonstrou também a toxicidade geral mais elevada ($CL_{50} = 0,55$ mg/L) e, portanto, a sua citotoxicidade foi testada em três linhas celulares tumorais humanas (HCT116 = 28.00 ± 2.00 ; MCF-7 = 35.00 ± 1.00 e NCI-H460 = 36.00 ± 2.00 µg/mL).

O extrato de *P. mutabilis* foi o mais bioativo e foi selecionado para a realização de técnicas cromatográficas de fracionamento e identificação estrutural por espectroscopia de 1H -RMN. Os trabalhos futuros de fitoquímica desta planta devem incluir o isolamento e caracterização estrutural dos principais constituintes bioativos responsáveis pelas atividades biológicas demonstradas neste estudo.

Palavras-chave: Produtos naturais, *Plectranthus*, atividade biológica, diterpenos, abietanos.

Abstract

In this work the biological activity of five species of *Plectranthus* genus (*P. mutabilis*, *P. lucidus*, *P. xerophilus*, *P. crassus* and *P. ciliatus*) was evaluated. The tested bioactivities were the antioxidant, by the DPPH method, and antimicrobial, by the well diffusion method, activities and the general toxicity, by the *Artemia salina* L. model.

The extract of *P. mutabilis* presented the highest extraction yield (30.3% (w/w)) and the highest antioxidant activity (46.14%). Demonstrated a significant antimicrobial activity against *S. aureus* (17 mm) and moderate against *C. albicans* (10 mm), so afterwards it was determined the MIC (31,25 e 125 µg/mL, respectively), MBC and MFC (125 µg/mL) values, by the microdilution method. This plant also demonstrated the highest general toxicity (LC₅₀ = 0,55 mg/L) and therefore, its cytotoxicity was tested on three human tumor cell lines (HCT116 = 28.00±2.00; MCF-7 = 35.00±1.00 e NCI-H460 = 36.00±2.00 µg/mL).

The extract of *P. mutabilis* was the most bioactive and it was selected for the realization of fractionation chromatographic techniques and structural identification by ¹H-NMR spectroscopy. The future phytochemical works of this plant should include the isolation and structural characterization of the main bioactive constituents responsible for the biological activities demonstrated in this study.

Keywords: Natural products, *Plectranthus*, biological activity, diterpenes, abietanes.

Abreviaturas, siglas e símbolos

% - Percentagem

% (m/m) – Percentagem massa por massa

% (m/v) – Percentagem massa por volume

® – Marca registada

°C – Graus Celsius

¹H-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogénio

A.C. – Antes de Cristo

Abs. – Absorvância

AcetilCoA – Acetil-coenzima A

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – Adenosina trifosfato

B. subtilis - *Bacillus subtilis*

BHA – Butil-hidroxianisol

BHT – di-*terc*-butil-metil-fenol (Butil-hidroxitolueno)

ccd – Cromatografia em camada delgada

CCFlash – Cromatografia em coluna *flash*

CCSV – Cromatografia em coluna seca sob vácuo

CDCl₃ – Clorofórmio deuterado

CI₅₀ – Concentração inibitória de 50%

CIP – *Collection of Institute Pasteur*

CL₅₀ – Concentração letal a 50%

CLSI – *Clinical & Laboratory Standards Institute*

cm – Centímetros

CMB – Concentração Mínima Bactericida

CMF – Concentração Mínima Fungicida

CMI – Concentração Mínima Inibitória

C_x – x átomos de carbono

DHR – 6,7-dehidrooleanona

DMAPP – Dimetilalil-difosfato

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

DXP – 1-Desoxilulose-5-Fosfato

E. coli – *Escherichia coli*

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

EFRV – *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina

ERO – Espécies Reativas de Oxigénio

ERV – *Enterococcus* resistentes à vancomicina

FDP – Farnesildifosfato

g – Grama

GDP – Geranildifosfato

GFPP – Geranilfarnesildifosfato

GGDP – Geranilgeranildifosfato

HGM-CoA – β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA

HSV-1 – Herpes simplex Vírus tipo 1

HSV-2 – Herpes Simplex Vírus tipo 2

IPP – Isopentenil-difosfato

K₂Cr₂O₇- Dicromato de Potássio

M. tuberculosis - *Mycobacterium tuberculosis*

MEP – Fosfato de metileritriol

mg – Miligrama

mg/L - Miligrama por litro

mg/mL – Miligrama por mililitro

MHz – Megahertz

mL – Mililitro

mm – Milímetro

NADPH – Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato (forma reduzida)

nm – Nanómetro

nº - Número

NO – Óxido nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

P. aegyptiacus - *Plectranthus aegyptiacus*

P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*

P. amboinicus - *Plectranthus amboinicus*

P. asirensis – *Plectranthus asirensis*

P. barbatus - *Plectranthus barbatus*

P. caninus - *Plectranthus caninus*

P. ciliatus – *Plectranthus ciliatus*

P. congestus - *Plectranthus congestus*

P. crassus – *Plectranthus crassus*

P. edulis - *Plectranthus edulis*

P. esculentus - *Plectranthus esculentus*

P. fruticosus - *Plectranthus fruticosus*

P. grandidentatus - *Plectranthus grandidentatus*

P. hadiensis - *Plectranthus hadiensis*

P. insignis - *Plectranthus insignis*

P. lanuginosus - *Plectranthus lanuginosus*

P. longipes - *Plectranthus longipes*

P. lucidus – *Plectranthus lucidus*

P. madagascariensis - *Plectranthus madagascariensis*

P. mandalensis - *Plectranthus mandalensis*

P. mollis - *Plectranthus mollis*

P. mutabilis – *Plectranthus mutabilis*

P. ornatus - *Plectranthus ornatus*

P. parviflorus - *Plectranthus parviflorus*

P. pubescens - *Plectranthus pubescens*

P. ramosior - *Plectranthus ramosior*

P. rugosus - *Plectranthus rugosus*

P. strigosus – *Plectranthus strigosus*

P. sylvestris - *Plectranthus sylvestris*

P. syringae - *Pseudomonas syringae*

P. Unguentarius - *Plectranthus Unguentarius*

P. vetiveroides - *Plectranthus vetiveroides*

P. xerophilus – *Plectranthus xerophilus*

ppm – Partes por milhão

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. cerevisiae - *Saccharomyces cerevisiae*

SARM – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

Séc. – Século

SRB – Sulforrodamina B

TCA – Ácido tricloroacético

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

α – Alfa

β – Beta

δ - Delta

$\mu\text{g/mL}$ – Micrograma por mililitro

μL – Microlitro

Índice

Índice de tabelas	17
Índice de figuras	18
Índice de esquemas	22
Introdução	22
1. A importância das plantas medicinais.....	23
2. O género <i>Plectranthus</i> L'Hér.....	25
2.1 Origem e Taxonomia.....	25
2.2 Características do género	28
2.3 Usos etnobotânicos.....	29
2.4 Propriedades fitoquímicas	32
2.4.1 Terpenos	32
2.4.1.1 Monoterpenos e Sesquiterpenos	36
2.4.1.2 Diterpenos.....	37
2.4.1.2.1 Abietanos	38
2.4.1.2.1.a) Roileanonas	39
2.4.1.2.1.b) Metóxidos de quinona	41
2.4.1.2.1.c) Espirocoleonas.....	42
2.4.1.2.1.d) Acil-hidroquinonas	43
2.4.1.2.1.e) Abietanóides fenólicos	44
2.4.1.2.1.f) Abietanóides diméricos.....	45
2.4.1.2.1.g) Quinonas estendidas	45
2.4.1.2.1.h) 1,4- fenantraquinonas	46
2.4.1.2.1.i) Abeo-acil-hidroquinonas	47
2.4.1.2.1.j) Seco-abietanóides.....	47
2.4.1.2.2 Filocladanos.....	48
2.4.1.2.3 Cauranos	48
2.4.1.2.4 Labdanos.....	49
2.4.1.2.5 Clerodanos	49
2.4.1.2.6 Halimanos.....	50
2.4.1.2.7 Pimaranos	50
2.4.1.2.8 Beieranos	51

2.4.1.3 Triterpenos.....	51
2.4.2 Compostos fenólicos	52
2.5 Espécies de plantas estudadas	54
2.5.1 <i>Plectranthus mutabilis</i> Codd	54
2.5.2 <i>Plectranthus ciliatus</i> E. Mey. ex Benth.	55
2.5.3 <i>Plectranthus lucidus</i> (Benth.) Van Jaarsv. & T.J.Edwards	58
2.5.4 <i>Plectranthus xerophilus</i> L. E. Codd	61
2.4.5 <i>Plectranthus crassus</i> N. E. Br.	63
3. Ensaio biológicos.....	65
3.1 Atividade antioxidante	65
3.2 Atividade antimicrobiana	67
3.3 Toxicidade geral.....	70
3.4 Citotoxicidade	72
Capítulo I: Parte experimental.....	74
1.1 Equipamentos, Reagentes e Materiais	75
1.1.1 Equipamentos	75
1.1.2 Reagentes	75
1.1.3 Materiais.....	75
1.1.4 Material das plantas.....	75
1.1.5 Espécies de micro-organismos	76
1.1.6 Linhas celulares tumorais humanas	76
1.1 Procedimento experimental.....	77
1.2.1 Preparação dos extratos e rendimento de extração	77
1.2.2 Determinação da atividade antioxidante	78
1.2.2. a) Ensaio qualitativo – Descoloração ccd-DPPH	78
1.2.2. b) Ensaio quantitativo - Método espectrofotométrico de DPPH.....	78
1.2.3 Ensaio da atividade antimicrobiana.....	79
1.2.3. a) Método de difusão em poços.....	79
1.2.3. b) Método de microdiluição - Determinação da CMI, CMB e CMF	79
1.2.4 Avaliação da toxicidade geral usando o modelo de <i>Artemia salina</i> L.	81
1.2.5 Ensaio de citotoxicidade em linhas celulares tumorais humanas.....	82
1.2.6 Estudo fitoquímico da espécie <i>P. mutabilis</i>	83
1.2.6.1 Fracionamento	83

1.2.6.1. a) Ccd preparativa e correspondente atividade antimicrobiana.....	83
1.2.6.1. b) Cromatografia em coluna	84
1.2.6.2 Método de identificação estrutural por ¹ H- RMN	86
Capítulo II: Resultados e Discussão	87
2.1 Preparação dos extratos e rendimento de extração	88
2.2 Determinação da atividade antioxidante	90
2.2.a) Ensaio qualitativo – Descoloração ccd-DPPH.....	90
2.2.b) Ensaio quantitativo - Método espectrofotométrico de DPPH	91
2.3 Ensaio da atividade antimicrobiana	92
2.3.a) Método de difusão em poços	93
2.3.b) Método de microdiluição - Determinação da CMI, CMB e CMF	94
2.4 Avaliação da toxicidade geral usando o modelo de <i>Artemia salina</i> L.....	96
2.5 Ensaio da citotoxicidade em linhas celulares tumorais humanas	99
2.6 Estudo fitoquímico da espécie <i>P. mutabilis</i>	100
2.6.1 Fracionamento.....	100
2.6.1.a) Ccd preparativa e correspondente atividade antimicrobiana.....	100
2.6.1.b) Cromatografia em coluna	102
2.6.2 Método de identificação estrutural por ¹ H- RMN.....	103
Conclusão	106
Bibliografia.....	109
Anexos.....	i
Anexo 1: Artigo de revisão – Naturally Occurring <i>Plectranthus</i> -derived Diterpenes with Antitumoral Activities.	ii

Índice de tabelas

Tabela 1 - Clades de <i>Coleus</i> e de <i>Plectranthus</i> , com os respectivos géneros, exemplos de espécies, diferenças morfológicas e áreas geográficas.	27
Tabela 2 – Exemplos de espécies de plantas do género <i>Plectranthus</i> utilizadas em vários trastornos biológicos.	30
Tabela 3 – Exemplos de espécies de plantas do género <i>Plectranthus</i> e respetivas utilidades, exceto medicinais.	31
Tabela 4 - Compostos fenólicos com as respetivas estruturas químicas.	53
Tabela 5 – Compostos e respetivos grupos químicos isolados da espécie <i>P. lucidus</i>	60
Tabela 6 - Compostos, já isolados e identificados, presentes no extrato da espécie <i>P. lucidus</i> e respetivas bioatividades.	61
Tabela 7 - Condições que afetam a suscetibilidade do método de difusão em agar e respetivas particularidades.	68
Tabela 8 - Vantagens do modelo de <i>Artemia salina</i> L.	71
Tabela 9 – Critérios e condições experimentais a cumprir no uso do modelo de <i>Artemia salina</i> L. para a avaliação da toxicidade geral.	72
Tabela 10 - Condições dos dois momentos de extração acetónica por ultrassons.	77
Tabela 11 – Eluentes e respetivas proporções utilizadas nas colunas cromatográficas.	85
Tabela 12 - Atividade antimicrobiana, de amostras de especiarias e vegetais, de acordo com os intervalos do valor de CMI ($\mu\text{g/mL}$).	94
Tabela 13 - Valores da CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do extrato da espécie <i>P. mutabilis</i> e dos controlos positivos (doxorrubicina e paclitaxel) contra linhas celulares tumorais humanas (HCT116, MCF-7 e NCI-H460).	99
Tabela 14 - Frações obtidas nas colunas cromatográficas e respetivas massas (g).	102

Índice de figuras

Figura 1 - Esporão presente na base da corola ou das sépalas, em algumas plantas do género <i>Plectranthus</i> (fonte: http://invasoras.pt/glossary/espao/ , consultado a 13/11/2018).....	25
Figura 2 - Estrutura química do Isopreno (Dewick, 2002).....	33
Figura 3 - Via do mevalonato (Dewick, 2002).....	33
Figura 4 - Via independente do mevalonato ou do DXP (Dewick, 2002).	34
Figura 5 – Formação dos terpenos (hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, diterpenos e tetraterpenos) a partir das moléculas IPP e DMAPP (Dewick, 2002).	35
Figura 6 - Via metabólica dos esqueletos de diterpenos mais comuns encontrados em <i>Plectranthus</i> : halimane (halimano), labdane (labdano), pimarane (pimarano), clerodane (clerodano), abietane (abietano), kaurane (caurano), phyllocladane (filocladano) e beyerane (beierano) (Figueiredo, Kaplan, & Gottlieb, 1995; Hack, Blümel, Chauhan, Philipps, & Enders, 2015; Rijo et al., 2013a).	38
Figura 7 - Estrutura química do esqueleto de abietano (Neto, Faustino, & Rijo, 2015).	39
Figura 8 - Estrutura química da classe roileanona (Abdel-Mogib et al., 2002).	40
Figura 9 - Estrutura química do composto 7 α -Acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (Garcia et al., 2018a).....	40
Figura 10 - Estrutura química do composto DHR (Abdissa, Frese & Sewald, 2017).....	41
Figura 11 - Estrutura química do composto parviflorona D (Garcia et al., 2018b).	41
Figura 12 - Estrutura química do composto lanugona K (Garcia et al., 2018b).....	42
Figura 13 - Estrutura química do composto coleona U (Abdel-Mogib et al., 2002).....	43
Figura 14 - Estrutura química do composto coleona C (Garcia et al., 2018b).....	43
Figura 15 - Estrutura química do composto ferruginol (González, 2014).	44
Figura 16 - Estrutura química do composto sugiol (Simões et al., 2010b).	45
Figura 17 - Estrutura química do composto grandidona A (Abdel-Mogib et al., 2002).	45
Figura 18 - Estrutura química do composto (16S)-coleona E (Abdel-Mogib et al., 2002).....	46
Figura 19 - Estruturas químicas de 1,4 – fenantraquinonas a) plectrantona B e b) b.1: plectrantona A; b.2: plectrantona C; b.3: plectrantona D e b.4: plectrantona E (Abdel-Mogib et al., 2002).....	46
Figura 20 - Estrutura química do composto edulona A (Abdel-Mogib et al., 2002).	47
Figura 21 - Estrutura química do composto nafetoquinona (Abdel-Mogib et al., 2002).	47

Figura 22 - Estrutura química do composto (16R)-17,19-Diacetoxi-16-hidroxi-13 β -cauran-3-ona (Abdel-Mogib et al., 2002).	48
Figura 23 – Estrutura química dos compostos ent-16-cauren-19-ol (1) e ácido ent-16-cauren-19-óico (2) (Gaspar-Marques et al., 2008).	49
Figura 24 – Estrutura química do composto forscolina (Garcia et al., 2018b).	49
Figura 25 – Estrutura química do esqueleto clerodano (Roncero, Tobal, Moro, Díez & Marcos, 2018).	50
Figura 26 – Estrutura química do esqueleto halimano (Roncero et al., 2018).	50
Figura 27 – Estrutura química do composto 15,16-epoxi-7 α -hidroxipimar-8,14-eno (Rijo et al., 2013a).	51
Figura 28 – Estrutura química do composto ácido ent-7 α acetoxi-15-beieren-18-óico (Simões et al., 2010b).	51
Figura 29 - Espécie <i>P. mutabilis</i> com flôr (fonte: https://www.inaturalist.org/observations/10947443 , consultado em 06/10/2018).	54
Figura 30 - Flôr da espécie <i>P. ciliatus</i> (Fonte: http://pza.sanbi.org/plectranthus-ciliatus , consultado a 31/01/2019; https://www.naturalista.mx/taxa/405011-Plectranthus-ciliatus , consultado em 06/10/2018).	55
Figura 31 - Caule da espécie <i>P. ciliatus</i> coberto de cílius roxos (fonte: http://pza.sanbi.org/plectranthus-ciliatus , consultada a 02/02/2019).	56
Figura 32 - Folhas da espécie <i>P. ciliatus</i> (fonte: http://pza.sanbi.org/plectranthus-ciliatus , consultada 02/02/2019; https://www.naturalista.mx/taxa/405011-Plectranthus-ciliatus , consultada a 02/02/2019).	56
Figura 33 - Folhas da espécie <i>P. lucidus</i> (fonte: http://pza.sanbi.org/plectranthus-lucidus , consultado a 29/01/19).	58
Figura 34 - Flores da espécie <i>P. lucidus</i> (fonte: https://www.inaturalist.org/observations/11110298 , consultado em 06/10/2018; http://pza.sanbi.org/plectranthus-lucidus , consultada a 29/01/19).	59
Figura 35 - Espécie <i>P. lucidus</i> “Albert” (fonte: https://www.inaturalist.org/observations/11110298 , consultado em 06/10/2018).	59
Figura 36 - Espécie <i>P. lucidus</i> “Bulolwe” (fonte: http://pza.sanbi.org/plectranthus-lucidus , consultada a 29/01/2019).	59
Figura 37 – Espécie <i>P. xerophilus</i> (fonte: https://candide.eu/ZA/plants/eaabf98455d9bdfef9c454fdb2d5b7f9 , consultado em 06/10/2018;	

http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=284147 , consultado a 07/11/2018).	62
Figura 38 - Espécie <i>P. crassus</i> (fonte: https://www.gapphotos.com/imagetdetails.asp?view=plectranthus-crassus-&imagero=112412 , consultado em 06/10/2018).	64
Figura 39 - Redução do DPPH com alteração da coloração da solução de roxo para amarelo (Pires et al., 2017).	66
Figura 40 - Náuplio de <i>Artemia salina</i> L. (Hamidi, Jovanova, & Panovska, 2014).	70
Figura 41 - Alguns passos do método de ccd preparativa a) Amostra em eluição na placa de ccd preparativa b) Comparação entre a placa de ccd preparativa e a placa de ccd para a separação das frações c) Sistema de filtração a vácuo para a desadsorção das frações da sílica (captado a 20/06/2018).	83
Figura 42 - Rendimento de extração (%), pelo método de ultrassons, das espécies <i>P. mutabilis</i> , <i>P. xerophilus</i> , <i>P. crassus</i> , <i>P. ciliatus</i> e <i>P. lucidus</i> (* - 1º momento da extração; ** - 2º momento da extração).	89
Figura 43 - Atividade antioxidante (%), pelo método espectrofotométrico de DPPH, dos extratos das espécies <i>P. mutabilis</i> , <i>P. ciliatus</i> , <i>P. xerophilus</i> , <i>P. crassus</i> e <i>P. lucidus</i> e controlo positivo (quercetina), a uma concentração de 1 mg/mL, com os respetivos desvios padrão.	91
Figura 44 - Atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em poços, dos extratos das espécies <i>P. ciliatus</i> , <i>P. mutabilis</i> , <i>P. lucidus</i> , <i>P. crassus</i> e <i>P. xerophilus</i> ; do controlo negativo DMSO e dos controlos positivos: vancomicina e norfloxacin para as bactérias (<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>E. coli</i>) e nistatina para as leveduras (<i>C. albicans</i> e <i>S. cerevisiae</i>) a uma concentração de 1 mg/mL.	93
Figura 45 - CMI, CMB e CMF (µg/mL) do extrato da espécie <i>P. mutabilis</i> , dos controlos positivos (vancomicina para <i>S. aureus</i> e estirpe de SARM e anfotericina B para <i>C. albicans</i>) e controlo negativo (DMSO), pelo método de microdiluição.	95
Figura 46 - Toxicidade geral, usando o modelo de <i>Artemia Salina</i> L., dos extratos das espécies <i>P. mutabilis</i> , <i>P. ciliatus</i> , <i>P. xerophilus</i> , <i>P. crassus</i> e <i>P. lucidus</i> (0,01 mg/mL) e dos controlos: negativo do solvente (DMSO a 0,01 mg/mL), negativo do meio (Sal) e positivo ($K_2Cr_2O_7$ a 100 mg/mL) com os respetivos desvios padrão.	96
Figura 47 - Gráfico da morte de <i>Artemia salina</i> L. (%) em função da concentração do extrato da espécie <i>P. mutabilis</i> (0,01; 0,1 e 1 mg/L), com os respetivos desvios padrão, para a determinação do valor de CL_{50} .	97

Figura 48 - Gráfico da morte de *Artemia salina* L. (%) em função da concentração do extrato da espécie *P. ciliatus* (0,1; 0,5 e 1 mg/L), com os respetivos desvios padrão, para a determinação do valor de CL₅₀.97

Figura 49 - Placa de ccd das frações A, B e C (polaridade sucessivamente crescente), do extrato da espécie *P. mutabilis*, e respetivas massas (g) (captado a 20/06/2018).**Erro! Indicador não definido.**

Figura 50 - Atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em poços, do extrato total e das frações A, B e C da espécie *P. mutabilis*, do controlo negativo DMSO e dos controlos positivos: norfloxacina e vancomicina para as bactérias (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*) e nistatina para as leveduras (*C. albicans* e *S. cerevisiae*), a uma concentração de 10 mg/mL. 101

Figura 51 - Espectro de ¹H-RMN da fração M4 (esquerda) com zoom na região dos 3,24 ppm (direita). 103

Índice de esquemas

Esquema 1 - Organização esquemática dos terpenos mais comuns presentes nas plantas do género <i>Plectranthus</i> (Figueiredo et al., 1995; Hack et al., 2015; Rijo et al., 2013a).	36
Esquema 2 – Procedimento realizado nos extratos das espécies <i>P. mutabilis</i> , <i>P. ciliatus</i> , <i>P. xerophilus</i> , <i>P. lucidus</i> e <i>P. Crassus</i>	82
Esquema 3 – Esquema das colunas realizadas em que D – diâmetro da coluna e QS – quantidade de sílica utilizada na coluna.	84
Esquema 4 - Esquema do procedimento do estudo fitoquímico da espécie <i>P. mutabilis</i>	86

Introdução

1. A importância das plantas medicinais

Ao longo dos tempos o Homem tem utilizado os produtos naturais com vários fins, entre os quais medicinais (Cragg & Newman, 2005).

Os registos mais antigos de terapêuticas com produtos naturais foram feitos em tabuletas de argila, em escrita cuneiforme, na Mesopotâmia no ano de 2600 A.C. e documentavam, por exemplo, plantas da espécie *Commiphora* (mirra) que ainda hoje são usadas para tratar tosse, resfriados e inflamações (Dias, Urban, & Roessner, 2012).

As plantas medicinais cultivadas há 60000 anos, têm sido a base da medicina tradicional e, para além do uso medicinal são também usadas com fins alimentícios, ornamentais, entre outros (Cragg & Newman, 2005; Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2017).

Os Egípcios e Chineses terão sido dos primeiros seres humanos a utilizar as plantas enquanto medicamentos. São provas disso o Papiro de Ebers do ano de 1500 A.C., um documento egípcio com cerca de 700 fármacos entre os quais a maioria são plantas, e o Matéria Médica Chinês do ano de 1100 A.C. que também relata a preparação de medicamentos através de plantas e os seus benefícios (Cragg & Newman, 2005; Dias et al., 2012; Samuelson & Bohlin, 2010).

Na Grécia Antiga também já se conheciam as propriedades medicinais de algumas plantas e Hipócrates, fundador da medicina grega, e Aristóteles, aprendiz de Hipócrates, usavam as plantas medicinais para o tratamento de doenças (Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2017).

Atualmente as plantas continuam a desempenhar um papel essencial nos cuidados de saúde, sendo bastante utilizadas como fonte de recurso terapêutico eficaz, quer para tratar quer para prevenir várias doenças (Freitas & Rodrigues, 2006; Ramawat & Merillon, 2008).

Nas últimas décadas a exigência por produtos de origem natural tem aumentado em 8% a 15% ao ano na Europa, América do Norte e Ásia (Rahman et al., 2017). Atualmente as áreas do cancro e das doenças infecciosas são maioritariamente dependentes de produtos naturais e, praticamente, todas as nações do mundo têm vindo a valorizar as atividades relacionadas com as plantas medicinais (Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2017; Pan, Chai, & Kinghorn, 2010; Ur Rahman et al., 2017).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu o potencial da medicina à base de plantas e estimou que mais de 80% da população mundial depende da medicina tradicional

e de medicamentos derivados de plantas, enquanto fonte de saúde primária (Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2017; Qazi & Molvi, 2016; Rijo et al., 2014).

As plantas medicinais são um recurso natural de baixo custo, muito disponível e acessível, satisfazendo o conceito de economia verde. Este conceito tem sido assumido como uma necessidade urgente para abordar os desafios globais em áreas como a energia, o ambiente e a saúde, e pretende construir uma economia efetiva e segura (Hussein, 2018; Mukul, Uddin & Tito, 2007).

Devido à sua complexa e diversificada composição as plantas são também importantes fontes de novos fármacos ou fármacos protótipo que podem ser otimizados (Dias et al., 2012; Rijo et al., 2012). As plantas medicinais têm sido objeto de estudos farmacológicos intensos permitindo a obtenção de novos agentes terapêuticos mais específicos e com menos reações adversas. (Matu & Van Staden, 2003; Ur Rahman et al., 2017).

É crucial preservar e manter a qualidade deste recurso biológico, as plantas medicinais, que ainda tem muito por explorar e que tantos benefícios pode dar aos seres humanos (Freitas & Rodrigues, 2006; Jamshidi-Kia, Lorigooini, & Amini-Khoei, 2017).

2. O género *Plectranthus* L'Hér

2.1 Origem e Taxonomia

Um exemplo de plantas medicinais são as plantas do género *Plectranthus* L'Hér (Ntungwe et al., 2017). Apresenta cerca de 300 a 350 espécies de arbustos ou ervas identificadas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Austrália, e Ilhas do Pacífico (Cretton et al., 2018; Grayer et al., 2010; Rijo et al., 2012; Rijo et al., 2014).

Algumas espécies de *Plectranthus*, nativas de África, foram introduzidas no Novo Mundo no séc. XVI seguindo os Descobrimentos Portugueses (Rijo et al., 2012) e o termo L'Hér é referente ao botânico francês Charles Louis L'Héritier de Brutelle (1746-1800) que fez a primeira descrição do género *Plectranthus* em 1788 (Van Jaarsveld, 2006).

L'Héritier terá centrado a descrição deste género no esporão (**Figura 1**) presente na base da corola ou das sépalas nos espécimes que tinha disponíveis: *Plectranthus fruticosus* e *Plectranthus punctatus*. Assim, o termo *Plectranthus* significa “flôr esporão”, que provém das palavras gregas *Plectron* (esporão) e *anthos* (flôr) (Rijo, Faustino & Simões, 2013; Van Jaarsveld, 2006; Waldia, Joshi, Pathak, & Joshi, 2011).

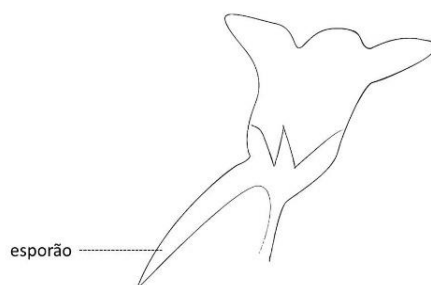


Figura 1 - Esporão presente na base da corola ou das sépalas, em algumas plantas do género *Plectranthus* (fonte: <http://invasoras.pt/glossary/espao/>, consultado a 13/11/2018).

No entanto, a maioria das plantas do género *Plectranthus* não possui este esporão na base da sua corola mas, após ter sido descrito e publicado, o nome *Plectranthus* foi aceite e utilizado (Van Jaarsveld, 2006).

Algumas destas plantas, devido ao seu odor, são também chamadas de Reis mariposa e são o maior grupo na família a que pertencem, família *Lamiaceae* ou *Labiatae*. A família *Lamiaceae* é angiospérmica e possui, para além do género *Plectranthus*, um conjunto valioso de géneros, que apresentam compostos biologicamente ativos, como *Salvia* (Sálvia), *Ocimum*

(Manjerição), *Mentha* (Hortelã), entre outros que possuem várias utilidades ornamentais, culinárias e medicinais (Naghbi, Mosaddegh, & Motamed, 2014; Ntungwe et al., 2017; Waldia et al., 2011).

As *Plectranthus* pertencem à subfamília *Nepetoideae*, tribo *Ocimeae* e subtribo *Plectranthinae* (Rice, Brits, Potgieter & Van Staden, 2011).

Algumas espécies do género *Plectranthus* demonstram critérios morfológicos ambíguos tornando-as difíceis de identificar, não apenas entre as espécies do género, mas também entre os géneros mais intimamente relacionados. Este facto terá levado a numerosos problemas taxonómicos em relação à nomenclatura das espécies, resultando na nomeação de espécies iguais com nomes diferentes, como por exemplo *Plectranthus barbatus* Andr. que pode ser chamada de *Plectranthus forskalaei* Willd, *Plectranthus grandis* (Cramer) R.H. Willemse ou de *Coleus barbatus* (Andr.) Benth, entre outros, todos nomes sinónimos desta espécie. Também o facto da maioria das revisões taxonómicas do género *Plectranthus* serem tendencialmente regionais, e não globais, e o facto do uso destas plantas ser distribuído a nível mundial, contribuem para o uso de múltiplos nomes taxonómicos para descrever a mesma espécie. Estes fenómenos dificultam a recolha de informação relativa aos usos etnobotânicos destas plantas e resultam na frequente colocação de espécies do género *Plectranthus* em géneros intimamente relacionados, como o género *Coleus* (Lukhoba, Simmonds, & Paton, 2006; Paton et al., 2004).

O género *Coleus* é o género taxonomicamente mais próximo do género *Plectranthus* pois existem ligeiras e ambíguas diferenças morfológicas entre estes. Por esta razão alguma dificuldade pode surgir na distinção das espécies destes géneros (Abdel-Mogib, Albar & Batterjee, 2002; Alvarenga, Gastmans, Rodrigues, Moreno, & Emerenciano, 2001; Paton, Mwanyambo & Culham et al., 2018). O género *Plectranthus* e o género *Coleus* são dois grandes grupos que constituem, para além de outros como a *Salvia* e a *mentha*, a subtribo *Plectranthinae* (Paton et al., 2018).

O género *Plectranthus* contém *clades* (termo em inglês para géneros com ancestral comum, como *Coleus* e *Plectranthus* que pertencem à subtribo *Plectranthinae*) que possuem os géneros: *Aeollanthus*, *Alvesia*, *Tetradenia*, *Thorncroftia*, *Capitanopsis*, *Plectranthus sensu stricto* (“em sentido estrito”) e *Equilabium* (Paton et al., 2018).

Na **Tabela 1** encontram-se as *clades* de *Coleus* e de *Plectranthus* com os respetivos géneros, exemplos de espécies, diferenças morfológicas e áreas geográficas.

Tabela 1 - Clades de *Coleus* e de *Plectranthus*, com os respectivos gêneros, exemplos de espécies, diferenças morfológicas e áreas geográficas.

Género	Clade	Género	Exemplos de espécies	Diferenças morfológicas	Área geográfica
Plectranthus	Plectranthus	Alvesia Welw.	Alvesia rosmarinifolia	Cálice expandido com três lóbulos.	África
		Aeollanthus Spreng.	Aeollanthus densiflorus	Cálice com um corte horizontal ao nível da base. Tubo do cálice achatado na zona mais próxima da corola.	África
	I	Tetradenia Benth.	Tetradenia fruticosa	Corola com simetria radial e tubo a direito em forma de funil.	África
		Thorncroftia N.E.Br	Thorncroftia longflora	Corola com simetria bilateral, com tubo a direito ou curvado para baixo e cilíndrico.	África
	II	Plectranthus L'Hér. (Plectranthus sensu stricto)	Plectranthus ciliatus; Plectranthus angustifolia	Cálice em forma de funil e lábios superior e inferior da corola com comprimentos iguais.	África e Ásia
	III	Capitanopsis S.Moore	Capitanopsis angustifolia	Cálice com várias formas e expandido. Corola com estreitamento e lóbulos laterais e superiores curtos.	Madagáscar
	IV	Equilabium Mwanyambo	Plectranthus mollis	Cálice em forma de funil. Corola em forma sigmóide e lábios superior e inferior do mesmo comprimento do tubo.	África e Ásia
	Coleus	A	Coleus Lour.	Plectranthus crassus; Anisochilus pallidus	Cálice em formato de funil. Corola com lábio superior mais curto do que o inferior.
B		Plectranthus xerophilus; Plectranthus barbatus			

(Paton et al., 2018).

O género *Equilabium* foi identificado por estudos filogenéticos que têm vindo a auxiliar na compreensão das relações existentes entre espécies de plantas do género *Plectranthus*, de modo a organizar melhor as classificações, tendo em conta os seus usos etnobotânicos, as suas características morfológicas e composição fitoquímica, pois estas variam ao longo da filogenia (Khalik, 2016; Paton et al., 2018). Também já se recorre à sequenciação de certas regiões de ADN para se determinar a filogenia de algumas plantas (Paton et al., 2004).

A hibridação natural, quando se verifica, também pode auxiliar a desvendar a história evolutiva e relações taxonómicas dos géneros, podendo ser detetada através da determinação da química dos óleos essenciais das plantas (Viljoen, Demirci, Başer, Potgieter, & Edwards, 2006).

Espécies do género *Plectranthus* L'Hér podem encontrar-se taxonomicamente classificadas no género *Coleus*, como são exemplo a espécie *Plectranthus crassus* e *Plectranthus xerophilus* (Paton et al., 2018) e já se terá observado, em estudos anteriores, que 70% das plantas medicinais do género *Plectranthus* pertencem ao género *Coleus*. A *clade* B de *Coleus* apresenta o maior número de usos medicinais registados e são as espécies *Plectranthus* do género *Coleus* as mais estudadas, quer taxonomicamente quer economicamente (Lukhoba et al., 2006; Paton et al., 2018).

2.2 Características do género

O género *Plectranthus* é atrativo e florífero. Sobrevive com pouca luz, é robusto e resistente à maioria das doenças e pragas das plantas. Adapta-se bem a ambientes quentes, secos e semi-secos porque possui raízes superficiais que crescem em camadas superiores do solo, que lhe permite necessitar de uma pequena quantidade de água. Este género cresce rapidamente sendo muito útil quando é necessário criar novos jardins, com grandes áreas a cobrir, num curto espaço de tempo (Abdel-Mogib et al., 2002; Lukhoba et al., 2006; Potgieter, Edwards, & Staden, 2009; Rice et al., 2011).

Pelo facto de terem as flores altas e de tubo curto, têm a particularidade de atrair insetos polinizadores, como espécies de abelhas solitárias, o falcão traça, entre outros (Rice et al., 2011). Estes insetos trazem grandes vantagens à produção agrícola, pois são essenciais para a disseminação de muitas espécies e para a preservação da biodiversidade dos ecossistemas (Potgieter, 2009, p.12-14; Rech, Agostini, Oliveira, & Machado, 2014).

Normalmente este género de plantas apresenta cerca de 1 a 2 metros de altura e tem glândulas de cor laranja distribuídas nas suas partes aéreas que contêm compostos como os diterpenos do tipo abietano. Podem ser anuais, com um ciclo de vida igual ou inferior a um ano, ou perenes, as folhas não caem e têm um ciclo de vida superior a dois anos (Hussein, 2018; Rabe & Van Staden, 1998; Rice et al., 2011).

As suas flores, normalmente, são pequenas e surgem no final do verão, princípio do outono com cores violeta, azul, rosa ou branco (Brits, Selchau, & Deuren, 2001). Apresentam, regra geral, um lábio superior curto constituído por quatro dentes e um lábio inferior mais comprido, côncavo, composto por um dente (Codd, 1984; Velazquez, 1997). No entanto, as flores deste género podem apresentar variações morfológicas de espécie para espécie, como se verificou na **Tabela 1**.

2.3 Usos etnobotânicos

Os caules, folhas, raízes e tubérculos de várias plantas deste género podem ser usados para fins medicinais, ornamentais, alimentícios, entre outros (Rice et al., 2011). Quanto aos usos medicinais as plantas do género *Plectranthus* possuem a capacidade de atuar em vários transtornos biológicos (Lukhoba et al., 2006). Na **Tabela 2** encontram-se exemplos de espécies do género *Plectranthus* e respetivos transtornos biológicos nos quais atuam.

Tabela 2 – Exemplos de espécies de plantas do género *Plectranthus* utilizadas em vários trastornos biológicos.

Sistema	Transtorno biológico	Exemplo da espécie do género <i>Plectranthus</i>
Gastrointestinal	Náuseas	<i>P. vettiveroides</i> na Índia
	Vómitos	
	Dores de estômago	
	Diarreia	<i>P. amboinicus</i> na Índia e África
	Infeções na boca	<i>P. barbatus</i> no Brasil
	Infeções no esófago	
	Espasmos intestinais	
	Gastrite	
Dérmico	Queimaduras	<i>P. fruticosus</i> na Roménia
	Feridas	<i>P. barbatus</i> no Quénia e na República democrática do Congo
	Hematoma com inchaço	
	Alergias cutâneas	<i>P. amboinicus</i> na Índia e na Malásia
	Picadas de inseto	
	Envelhecimento	
	Assadura	<i>P. asirensis</i> na Arábia Saudita
	Comichão	<i>P. congestus</i> na Papua Nova Guiné
	Sarna	
Respiratório	Tosse	<i>P. amboinicus</i> na Índia, Caraíbas e Cuba
	Asma	
	Bronquite	
	Catarro	
	Constipação	<i>P. barbatus</i> na África
	Pneumonia	<i>P. aegyptiacus</i> na Arábia Saudita
	Laringites	
Músculoesquelético	Dor muscular	<i>P. barbatus</i> na África
	Deslocação óssea	
	Reumatismo	
Nervoso	Depressão	<i>P. pubescens</i> e <i>P. mandalensis</i> no Malawi
	Insónia	<i>P. barbatus</i> na África, Ásia e América do Sul
Outros	Infeção genitourinária	
	Infeção nos ouvidos	
	Infeção nos olhos	
	Febre	<i>P. sylvestris</i> no leste de África
	Malária	
	Cólera	<i>P. amboinicus</i> na Ásia e América do Sul
	Cefaleia	
	Herpes tipo 1	
	Sífilis	<i>P. barbatus</i> na África, Ásia e América do Sul
	Hipertensão	
	Dor de dentes	<i>P. caninus</i> no leste da África tropical
	Cancro	<i>P. mollis</i> na Índia

(Brito et al., 2018; Lukhoba et al., 2006; Rijo, Gaspar-Marques, Simões, Jimeno & Rodríguez, 2007).

Existem ainda registos de alguns extratos de *Plectranthus* com atividade antiparasitária, antisséptica, anti-VIH, purgativa, carminativa, relaxante muscular, antifúngica,

contraceptiva e afrodisíaca. Estas plantas podem ser administradas oralmente, aplicadas na pele ou como enemas (Brito et al., 2018; Lukhoba et al., 2006; Rijo et al., 2007).

Além dos usos medicinais, estas plantas possuem ainda outras utilidades, as quais, se encontram identificadas na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Exemplos de espécies de plantas do género *Plectranthus* e respetivas utilidades, exceto medicinais.

Utilidade	Exemplos de espécies do género <i>Plectranthus</i>
Amuleto para propósitos religiosos ou espirituais	<i>P. hadiensis</i> (Forssk.) Schweinf. ex Spreng.
Aromatizante	Raízes da <i>P. Unguentarius</i> (ingrediente numa pomada aromática para senhoras) na Namíbia.
Repelente de insetos	Sementes da <i>P. mollis</i> (fritas em óleo de mostarda e espalhadas no corpo).
Erva culinária para dar sabor aos alimentos	Caule da <i>P. esculentus</i> (para adoçar papa de cereal) usados no Embu, Quénia, e as folhas da <i>P. crassus</i> na Hungria.
Alimento propriamente dito	Tubérculo da <i>P. esculentus</i> (rico em minerais, carboidratos e vitamina A, que pode ser usado como substituinte da batata-doce) e as folhas da <i>P. mollis</i> e da <i>P. barbatus</i> (cozinhadas como vegetais na Índia).
Material	<i>P. insignis</i> (única espécie cuja madeira é usada para construir abrigos).
Limpeza	Folhas da <i>P. barbatus</i> , no Quénia.
Ornamental	<i>P. lucidus</i> (usada como planta de vaso) na Europa.
Fertilizante de solo agrícola e proteção da erosão do solo	<i>P. barbatus</i>
Alimento para cabras, ovelhas e gado	<i>P. barbatus</i> no Quénia e no Yemen

(Abdel-Mogib et al., 2002; Brito et al., 2018; Lukhoba et al., 2006; Rice et al., 2011).

Apesar dos inúmeros benefícios apresentados por estas plantas, é importante mencionar que algumas delas já provocaram reações adversas em seres humanos e em animais domésticos. Por exemplo: *P. barbatus* causa dermatite perianal, *P. longipes* e *P. caninus* são venenosas para o gado, *P. fruticosus* e *P. barbatus* apresentam fetotoxicidade e embriotoxicidade em roedores e o contacto com espécies *Plectranthus* não identificadas já terá causado irritação cutânea e dermatite em pessoas suscetíveis. É por isso importante tomar conhecimento dos efeitos destas plantas, procedendo à sua investigação, de modo a usá-las de forma segura e a beneficiar das suas propriedades (Lukhoba et al., 2006; Rice et al., 2011).

Para além das espécies mencionadas do género *Plectranthus* existem outras, presentes nos mesmos habitats, cujo uso não está ainda identificado. Isto pode dever-se ao facto de se tratarem de espécies raras, usadas com pouca frequência ou com uso não documentado (Lukhoba et al., 2006; Rice et al., 2011).

Como é possível constatar, as plantas do género *Plectranthus* possuem uma grande diversidade de usos etnobotânicos que justificam o seu interesse. No entanto, são maioritariamente citadas na literatura pelos seus usos e propriedades medicinais, que perfazem 85% da sua utilidade (Abdel-Mogib et al., 2002; Lukhoba et al., 2006; Rice et al., 2011).

2.4 Propriedades fitoquímicas

Os metabolitos secundários presentes nas plantas podem dividir-se em três grandes categorias: alcalóides, terpenos e compostos fenólicos. (Devappa, Makkar, & Becker, 2011).

As espécies da família *Lamiaceae* são conhecidas por conterem terpenos farmacologicamente ativos, com um espectro de bioatividade extenso, com potencial na descoberta de novos fármacos (Bohlmann & Gershenzon, 2009; Hussein, 2018). As plantas do género *Plectranthus* possuem como principais constituintes fitoquímicos diterpenos, triterpenos, óleos essenciais (que contêm monoterpenos e sesquiterpenos) e compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) (Abdel-Mogib et al., 2002; Moghaddam & Mehdizadeh, 2017; Rijo et al., 2012).

2.4.1 Terpenos

Os terpenos são compostos naturais que formam o maior e mais diversificado grupo de fitoquímicos (Devappa, Makkar, & Becker, 2011).

São voláteis na forma líquida, comumente encontrados em óleos essenciais ou resinas, contêm carbono, hidrogénio e oxigénio e podem ser quimicamente classificados como álcoois, hidrocarbonetos, cetonas e epóxidos (Doughari, 2012; Mendanha, Moura, Anjos, Valadares, & Alonso, 2013).

Os terpenos são essenciais para a sobrevivência dos organismos que os produzem, atraindo insetos polinizadores, mediando interações inter e intra espécies, controlando processos metabólicos, protegendo contra predadores, entre outros (Devappa, Makkar, & Becker, 2011).

Possuem propriedades biológicas muito relevantes: anti-inflamatória (Prakash, 2017), repelente, antifúngica (Rabe & Van Staden, 1998) antiproliferativa, citotóxica (Menon & Gopalakrishnan, 2015), antimicrobiana (contra várias espécies de bactérias Gram-positivas e

Gram negativas, como *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SARM)) e outras (Ludwiczuk, Skalicka-Woźniak, & Georgiev, 2017).

O isopreno (**Figura 2**) é o bloco fundamental para a formação dos terpenos (Dewick, 2002).

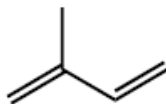


Figura 2 - Estrutura química do Isopreno (Dewick, 2002).

As unidades de isopreno bioquimicamente ativas são o dimetilalil difosfato (DMAPP) e o isopentenil difosfato (IPP) (Dewick, 2002). Estas unidades podem surgir através de dois processos: por meio de intermediários do ácido mevalônico (um produto do metabolismo do acetato), denominada via do mevalonato, ou pelo 1-Desoxilulose-5-Fosfato (DXP), via do DXP, também conhecida por via do fosfato de metileritriol (MEP) ou via independente do mevalonato (Dewick, 2002; Ludwiczuk et al., 2017).

Na via do mevalonato (**Figura 3**), três moléculas de acetil-coenzima A (AcetilCoA) são utilizadas para formar ácido mevalônico. Inicialmente duas moléculas de AcetilCoA originam Acetoacetyl-CoA e, posteriormente, com a terceira molécula de AcetilCoA obtém-se β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). A enzima HMG-CoA redutase reduz este último composto e origina o mevalonato. Posteriormente com moléculas de adenosina trifosfato (ATP) o mevalonato converte-se em IPP. (Dewick, 2002; Lanzotti, 2013; Wanke, Skorupinska-Tudek, & Swiezewska, 2001).

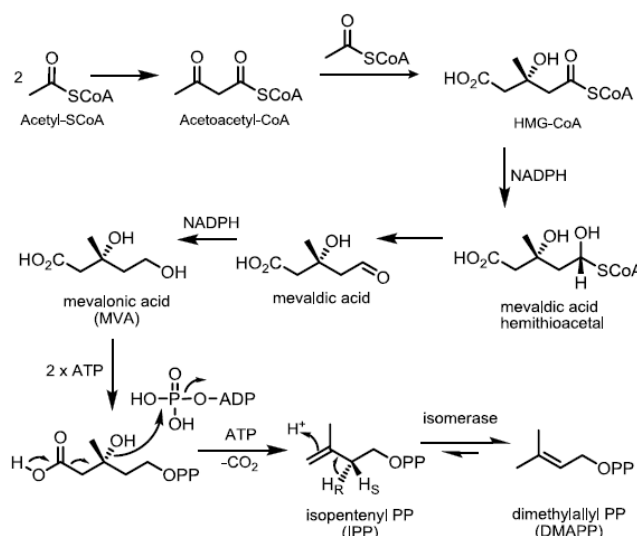


Figura 3 - Via do mevalonato (Dewick, 2002).

Na via independente do mevalonato (**Figura 4**), o DXP é formado a partir da condensação dos intermediários da via glicolítica, ácido pirúvico e gliceraldeído 3-fosfato. Posteriormente, o DXP sofre uma reação de rearranjo e de redução com Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato (NADPH) originando fosfato de metileritriol (MEP) que vai depois dar origem ao IPP (Dewick, 2002; Kuzuyama & Seto, 2003; Lanzotti, 2013).

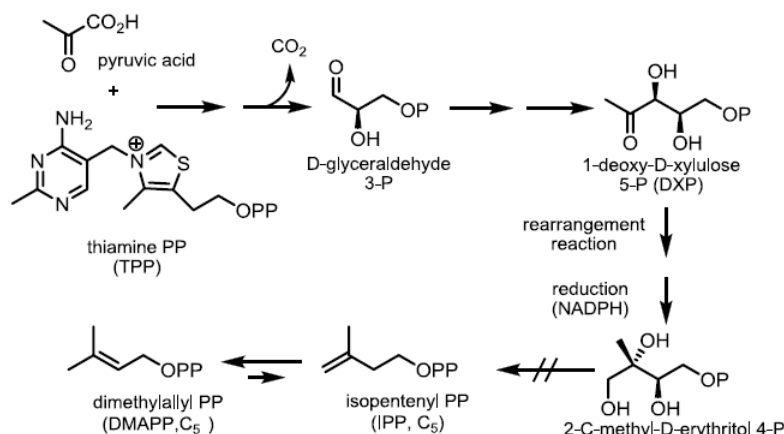


Figura 4 - Via independente do mevalonato ou do DXP (Dewick, 2002).

Para se indentificar qual das vias, via do mevalonato ou via do DXP, origina o ou os isoprenos que posteriormente constituem determinado terpeno, é necessário proceder a uma análise experimental. Os animais não possuem a via do DXP utilizando apenas a via do mevalonato e nas plantas ambas as vias funcionam em simultâneo (Dewick, 2002; Lanzotti, 2013).

As enzimas da via do mevalonato estão localizadas no citosol e as da via do DXP são encontradas no cloroplasto e há casos, como os triterpenóides e esteróides, em que ambas as vias podem originar diferentes porções da mesma molécula contribuindo com unidades de isopreno, para a obtenção de um determinado terpeno (Dewick, 2002; Lanzotti, 2013).

O IPP formado, forma de isopreno bioquimicamente ativa, dá origem ao DMAPP por isomerização. A condensação catalisada de duas destas unidades C₅, origina o geranildifosfato (GDP). A adição de mais um IPP ao GDP dá origem ao farnesildifosfato (FDP) e a adição de um outro grupo IPP ao FDP, resultando numa molécula com 20 carbonos, origina o geranilgeranildifosfato (GGDP). Várias reações redox, catalisadas por enzimas ciclase, ocorrem posteriormente nestas moléculas, dando origem aos vários terpenos que existem (Bohlmann, Meyer-Gauen, & Croteau, 1998; Dewick, 2002; Wink, 2010).

Os terpenos de acordo com o número de unidades isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno (C_5H_8)) e número de carbonos (C_x) que possuem, podem ser classificados em: hemiterpeno (C_5 com uma unidade isopreno), monoterpreno (C_{10} com duas unidades isopreno), sesquiterpeno (C_{15} com três unidades isopreno), diterpeno (C_{20} com quatro unidades isopreno), sesterterpeno (C_{25} com cinco unidades isopreno), triterpeno (C_{30} com seis unidades isopreno), tetraterpeno (C_{40} com oito unidades isopreno) e politerpeno (acima de C_{40} com mais de oito unidades isopreno). (Lovkova, Buzuk, Sokolova, 2001; Ludwiczuk et al., 2017).

Portanto, o GDP irá dar origem aos monoterpenos, o FDP aos sesquiterpenos e o GGDP aos diterpenos. Duas moléculas de FDP dão origem aos triterpenos e duas moléculas de GGDP aos tetraterpenos (Bohlmann et al., 1998; Dewick, 2002; Wink, 2010).

O processo de formação dos terpenos encontra-se esquematizado na **Figura 5**.

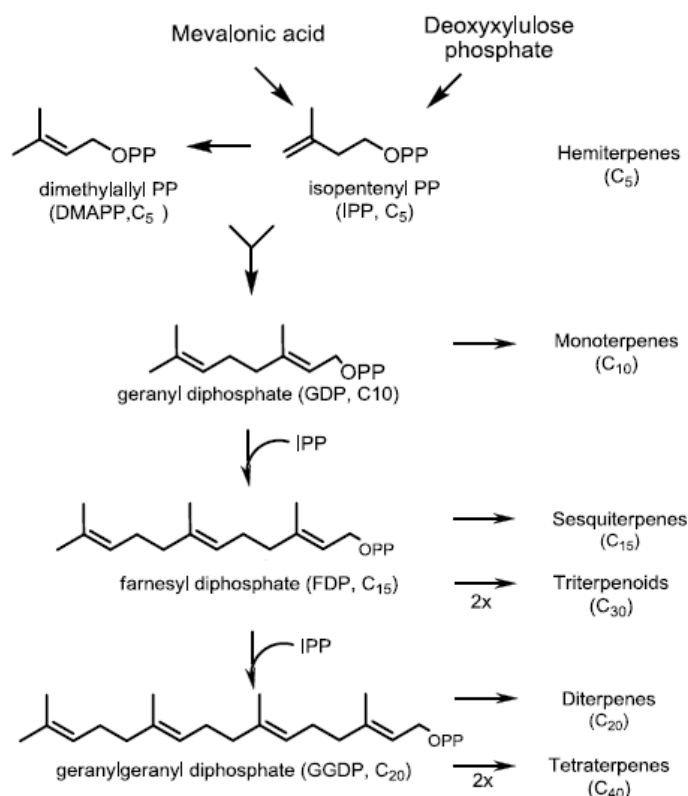
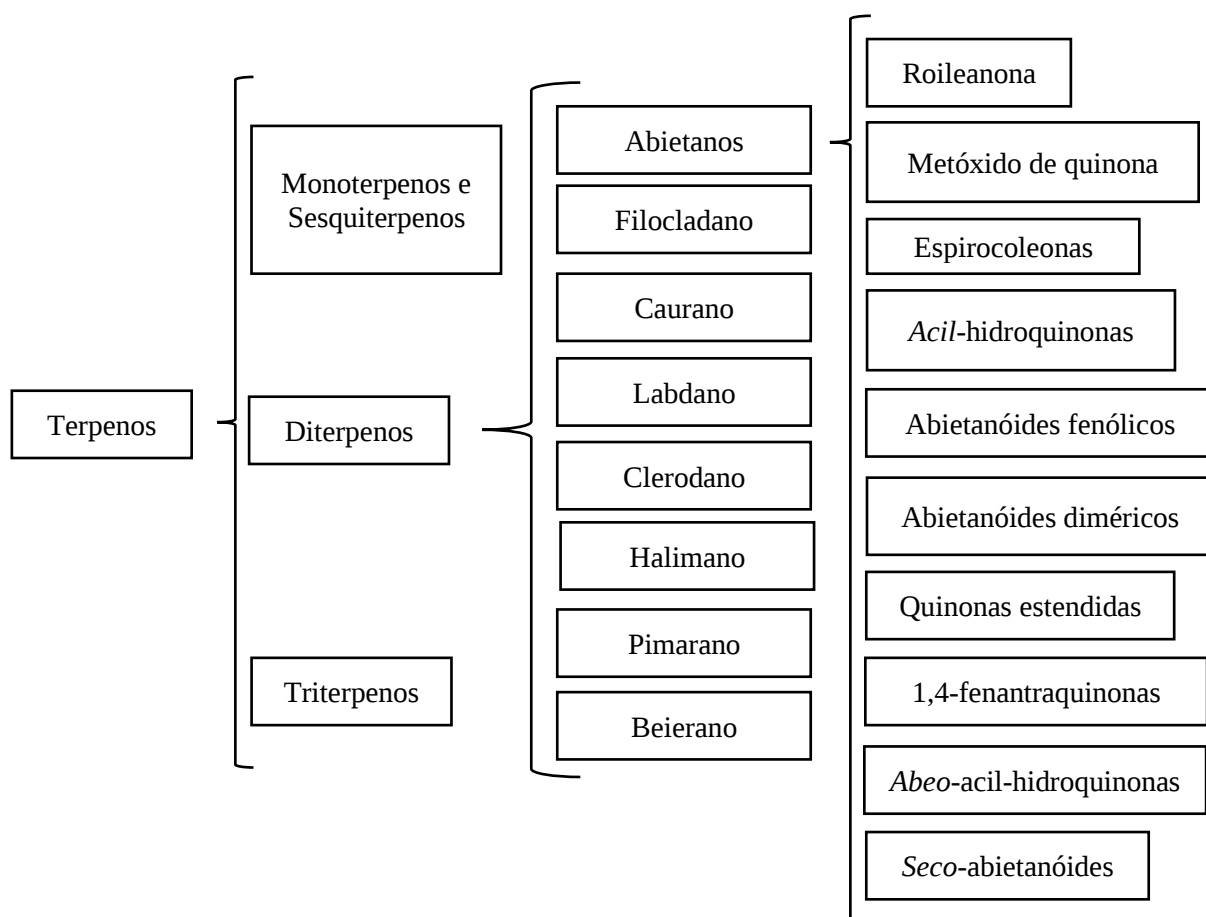


Figura 5 – Formação dos terpenos (hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, diterpenos e tetraterpenos) a partir das moléculas IPP e DMAPP (Dewick, 2002).

O isomerismo é muito comum nos terpenos e por essa razão estes compostos apresentam-se como um verdadeiro desafio para os químicos de síntese, disponibilizando muitas opções na produção de novas moléculas sintéticas. Os terpenos podem ainda sofrer reações de oxidação convertendo-se em terpenóides (Ladeiras et al., 2016).

Em resumo, e de forma a permitir um melhor entendimento quanto à classificação dos terpenos, segue-se o **Esquema 1** com a apresentação dos esqueletos e classes mais comuns, presentes nas *Plectranthus* e descritos de seguida.



Esquema 1 - Organização esquemática dos terpenos mais comuns presentes nas plantas do género *Plectranthus* (Figueiredo et al., 1995; Hack et al., 2015; Rijo et al., 2013a).

2.4.1.1 Monoterpenos e Sesquiterpenos

Os monoterpenos e sesquiterpenos são dos principais constituintes dos óleos essenciais. Estes são importantes para a comunicação entre plantas, para atrair insectos polinizadores e para repelir predadores (Böttger, Vothknecht, Bolle, & Wolf, 2018; Garcia et al., 2018b). São também os óleos essenciais os principais responsáveis pela natureza aromática destas plantas e contribuem para as suas bioatividades como propriedades antioxidante (baixa a moderada), antimicrobiana (significativa contra bactérias Gram-positivas), citotóxica, antifúngica, inseticida e repelente (Arumugam, Swamy, & Sinniah, 2016; Mota et al., 2014; Mothana et al., 2018).

Apesar dos óleos essenciais serem predominantemente compostos por monoterpenos e sesquiterpenos, já se terá identificado um diterpeno enquanto componente maioritário do óleo essencial da espécie *P. madagascariensis*, 6, 7-dihidroroileanona (Garcia et al., 2018b).

Os monoterpenos α -pineno, camfeno, limoneno e α -terpineno são exemplos de componentes dos óleos essenciais presentes na planta *P. rugosus* que já terão demonstrado propriedades antifúngicas contra *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* (Abdel-Mogib et al., 2002; Moghaddam & Mehdizadeh, 2017; Singh, 2017). Existem também monoterpenos com atividade inseticida demonstrada (Gnankiné & Bassolé, 2017).

Os sesquiterpenos já demonstraram atividade antifúngica, contra vários fungos humanos e fitopatogênicos, atividade contra a leishmaniose e contra a doença de chagas (Amina et al., 2018; Singh, 2017). Neste grupo de terpenos é muito comum ser encontrado o composto aristolano (Rijo, Simões, & Rodríguez, 2005).

2.4.1.2 Diterpenos

É na família *Lamiaceae* que a maior parte dos diterpenos são encontrados sendo os metabolitos secundários mais comuns nas plantas do género *Plectranthus* (Abdel-Mogib et al., 2002).

São uma classe heterogênea de compostos naturais que se encontram amplamente distribuídos tanto em organismos terrestres como marinhos e inclusive em micro-organismos (Lanzotti, 2013).

Os diterpenos isolados já demonstraram atividades antibacteriana, antifúngica, inseticida (Rice et al., 2011), anti-tumoral (Burmistrova et al., 2015), anti-inflamatória (Garcia et al., 2018b), antiviral, antidiabética (Jian, Zhang, & Liu, 2018), antimalárica (Kalauni et al., 2006), antioxidante, entre outras (Garcia et al., 2018b).

O Paclitaxel (Taxol®), por exemplo, é um diterpeno biologicamente ativo isolado da espécie *Taxus brevifolia* que apresenta propriedades anticancerígenas, interferindo com os microtúbulos e com a apoptose. É usado, atualmente, em tratamentos do cancro do ovário, mama, pulmão, cabeça e pescoço (Ladeiras et al., 2016).

Nos estudos fitoquímicos existe um interesse cada vez maior em isolar diterpenos ou diterpenóides (diterpenos oxidados). Este é o grupo mais estudado de compostos secundários no género *Plectranthus*, devido às várias atividades biológicas, já mencionadas, que apresentam (Abdel-Mogib et al., 2002; Ladeiras et al., 2016). A multiplicidade de propriedades

farmacológicas demonstradas deve-se à diversidade do modo de ciclização (bicíclico, tricíclico, tetracíclico ou macrocíclico) do esqueleto de hidrocarbonetos e à vasta gama de grupos funcionais de oxigénio que estes contêm. (Rijo, Duarte, Francisco, Semedo-lemsaddek & Simões, 2013b).

De acordo com a pesquisa bibliográfica os tipos de esqueleto de diterpenos, mais comuns encontrados no género *Plectranthus* são: abietanos, cauranos, labdanos, filocladanos, pimaranos, halimanos, beieranos e clerodanos cuja via metabólica se encontra no **Figura 6** (Gaspar-Marques, Simões, & Rodríguez, 2004; Hussein, 2018; Rijo et al., 2013b).

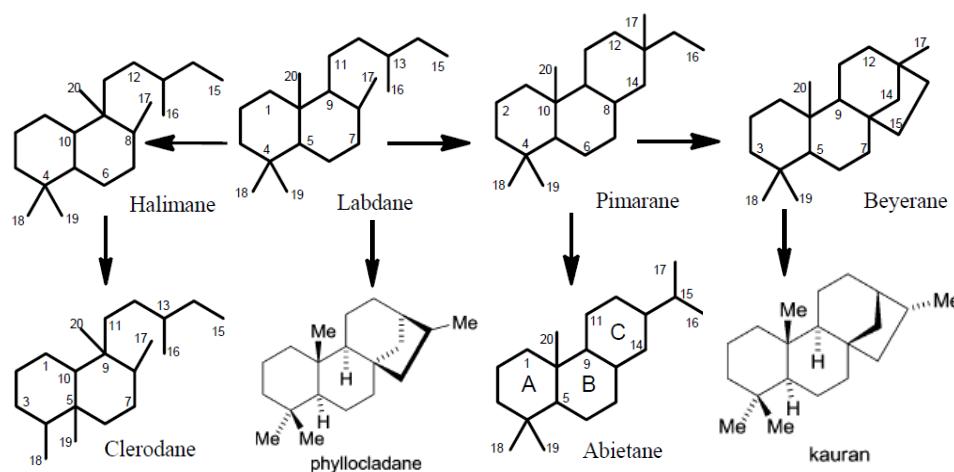


Figura 6 - Via metabólica dos esqueletos de diterpenos mais comuns encontrados em *Plectranthus*: *halimane* (halimano), *labdane* (labdano), *pimarane* (pimarano), *clerodane* (clerodano), *abietane* (abietano), *kaurane* (caurano), *phyllocladane* (filocladano) e *beyerane* (beierano) (Figueiredo, Kaplan, & Gottlieb, 1995; Hack, Blümel, Chauhan, Philipps, & Enders, 2015; Rijo et al., 2013a).

Já se terão identificado cerca de 140 compostos diterpenóides das glândulas foliares de plantas do género *Plectranthus*, sendo a maioria deles abietanóides (abietanos oxidados) altamente modificados (Abdel-Mogib et al., 2002; Rijo et al., 2007). Os abietanos são o grupo mais diversificado e também o maioritário na composição destas plantas (Lukhoba et al., 2006). Posteriormente aos abietanos, os filocladanos, cauranos, labdanos e clerodanos são os mais presentes no género *Plectranthus* (McGaw, Lall, Meyer, & Eloff, 2008; Rijo et al., 2005).

2.4.1.2.1 Abietanos

O esqueleto de abietano existe em grande quantidade na família *Lamiaceae* e possui uma estrutura tricíclica (**Figura 7**) (Alvarenga et al., 2001; Garcia et al., 2018b).

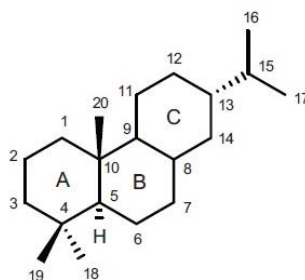


Figura 7 - Estrutura química do esqueleto de abietano (Neto, Faustino, & Rijo, 2015).

Apresentam várias atividades biológicas: antibacteriana, protetora das plantas contra insetos (Wellsow et al., 2006), anti-úlceras, antioxidante, anti-inflamatória, cardiovascular e citotóxica, nomeadamente contra células de leucemia humana, entre outras (Burmistrova et al., 2013; González, 2015).

Os abietanos para além de serem os compostos principais na constituição de muitas plantas do género *Plectranthus* são, também, dos mais estudados. (Abdel-Mogib et al., 2002; Burmistrova et al., 2015).

Estes compostos podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química em roileanonas, espirocoleonas, quinonas estendidas, metóxidos de quinona, acil-hidroquinonas, *abeo*-acil-hidroquinonas, abietanóides fenólicos, 1,4- fenantraquinonas, abietanóides diméricos e *seco*-abietanóides. Os dois primeiros grupos são os mais frequentes nas *Plectranthus* (Dellar, Cole, Waterman, & Street, 1996; Teixeira et al., 1997; Wellsow et al., 2006).

As roileanonas, espirocoleonas, quinonas estendidas, metóxidos de quinona, acil-hidroquinonas, *abeo*-acil-hidroquinonas e 1,4- fenantraquinonas possuem grupos quinona e grupos fenóis na sua constituição (Garcia et al., 2018a; Garcia et al., 2018b). As quinonas são a segunda maior classe de agentes antitumorais clinicamente aprovados (Guédouar, Aloui, Beltifa, Ben Mansour, & Ben Hassine, 2017) e têm um elevado potencial antimicrobiano (Cowan, 1999); os fenóis possuem propriedade antioxidante que previne a lesão celular e, consequentemente, uma série de patologias como o cancro e outras relacionadas com o envelhecimento (Foti, 2007).

2.4.1.2.1.a) Roileanonas

As roileanonas (**Figura 8**) têm sido extensivamente estudadas e já demonstraram possuir propriedades como: gastroprotetora, citotóxica, antioxidante, antifúngica, anti-inflamatória (Ladeiras et al., 2016; Garcia et al., 2018b), antimicrobiana (contra *Enterococcus*

Gram-positivos e estirpes de *Staphylococcus aureus*) (Gaspar-Marques, Rijo, Simões, Duarte, & Rodriguez, 2006; Rijo et al., 2013b) , antituberculose, entre outras (Andrade et al., 2018; Ladeiras et al., 2016).

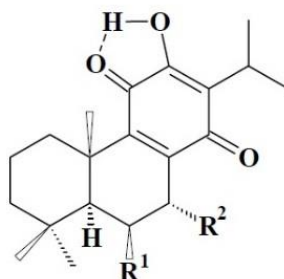


Figura 8 - Estrutura química da classe roileanona (Abdel-Mogib et al., 2002).

O composto 7 α -Acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (**Figura 9**) pertence ao grupo das roileanonas e já terá sido isolado e caracterizado. Está presente, por exemplo, na espécie *P. ramosior* e estão descritas várias atividades biológicas deste composto: atividade antitumoral (propriedade anti-proliferativa e citotóxica quando analisado em linhas de células de cancro da mama e outras linhas celulares cancerígenas) (Garcia et al., 2018b; Ladeiras et al., 2016; Ntungwe et al., 2018); antimicrobiana (atividade contra SARM e *Enterococcus faecalis* resistentes à vancomicina (EFRV)); imunomoduladora (capacidade antiproliferativa de linfócitos B e T) (Garcia et al., 2018b) e antituberculose (contra estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes, demonstrando uma concentração mínima inibitória (CMI) mais baixa comparada com os antibióticos de primeira linha para a tuberculose, isoniazida e rifampicina) (Andrade et al., 2018).

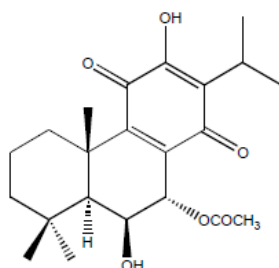


Figura 9 - Estrutura química do composto 7 α -Acetoxi-6 β -hidroxiroileanona (Garcia et al., 2018a).

Também o composto 6,7-dihidroroileanona (DHR) (**Figura 10**), já isolado e caracterizado da espécie *P. madagascariensis*, é um abietano do tipo roileanona, citotóxico cuja atividade não interfere com a formação dos microtúbulos (essenciais para a multiplicação

celular) mas afeta a glicoproteína P (bomba de efluxo que contribui para o fenómeno de resistência a múltiplos fármacos) e ativa intensivamente as caspases-3 e -9 (protéases que desempenham um papel fundamental na apoptose) (Garcia et al., 2018a; Ren, Yu, Gao, Liu, 2017).

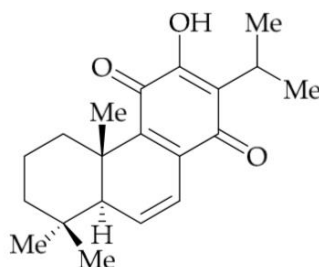


Figura 10 - Estrutura química do composto DHR (Abdissa, Frese & Sewald, 2017).

Não existem muitos estudos referentes à seletividade citotóxica de abietanos, exceto para DHR e para coleona U (*Acil*-hidroquinona descrita mais à frente) que demonstram um perfil de seletividade citotóxica em algumas linhas celulares tumorais, sem exercerem efeitos tóxicos em células saudáveis (Garcia et al., 2018b).

O composto DHR possui, também, atividade antituberculose (Andrade et al., 2018) e ,tal como outras roileanonas, apresenta-se como um bom ponto de partida para o desenvolvimento de fármacos com melhor potência, selectividade, menor toxicidade, e menos efeitos adversos, contra *M. tuberculosis* (Rijo et al., 2010).

2.4.1.2.1.b) Metóxidos de quinona

Os metóxidos de quinona possuem propriedades citotóxicas e citoprotetoras (Bolton, 2014). Um exemplo de um composto deste grupo é a parviflorona D (**Figura 11**) isolada pela primeira vez da espécie *P. parviflorus*. (Garcia et al., 2018b; Hussein, 2018).

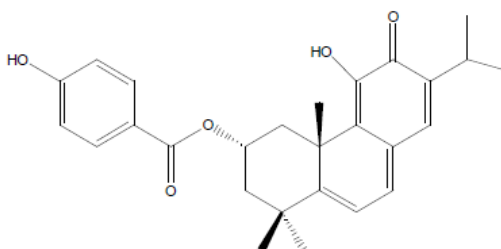


Figura 11 - Estrutura química do composto parviflorona D (Garcia et al., 2018b).

Apresenta atividade antioxidante, capacidade de proteger o ADN plasmídico da clivagem oxidativa (lesões causadas no ADN pelas espécies reativas de oxigénio) (Rosa et al., 2015) e atividade antimicrobiana (inibe o crescimento de estirpes de *S. aureus*, de *E. faecalis* e de *M. tuberculosis*) (Simões, Rijo, Duarte, Matias, & Rodríguez, 2010a).

Compostos obtidos da parviflorona D demonstraram atividade contra *Enterococcus hirae* e SARM (Simões et al., 2010a; Nyila, Leonard, Hussein, & Lall et al, 2009).

A parviflorona D é um potente citotóxico e indutor de apoptose contra várias linhas de células tumorais humanas, sem atuar nos microtúbulos, como por exemplo células de melanoma, células com superexpressão da glicoproteína P e células de leucemia (Garcia et al., 2018b).

Apesar deste composto ainda necessitar de ser testado em modelos mais próximos das células humanas já terá demonstrado, *in vitro*, resultados muito promissores podendo, portanto, ser considerado para testes pré-clínicos e *in vivo*. (Burmistrova et al., 2015; Garcia et al., 2018b; Silva et al., 2016).

2.4.1.2.1.c) Espirocoleonas

As espirocoleonas também possuem os grupos fenol e quinona e já demonstraram possuir atividades relevantes (Garcia et al., 2018b).

Um exemplo dum composto deste grupo é a lanugona K (**Figura 12**), já extraída e caracterizada da espécie *P. lanuginosus*, que apresenta atividade anti-inflamatória (Cretton et al., 2018).

A *P. caninus* é uma espécie cujas glândulas são uma fonte principal de espirocoleonas, nomeadamente coleonas R,M,N,Q, P, entre outras (Garcia et al., 2018b).

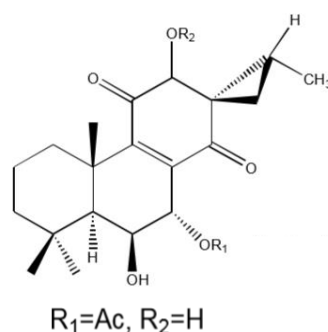


Figura 12 - Estrutura química do composto lanugona K (Garcia et al., 2018b).

2.4.1.2.1.d) Acil-hidroquinonas

A coleona U (**Figura 13**), um abietano do grupo das *acil*-hidroquinonas, pode ser encontrado por exemplo na espécie *P. grandidentatus* (Cerqueira et al., 2004). Apresenta propriedade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas syringae*, estirpes de SARM e estirpes EFRV (Garcia et al., 2018b); capacidade imunomoduladora (Cerqueira et al., 2004); potente atividade citotóxica e atividade antiproliferativa contra várias linhas de células tumorais humanas (nomeadamente contra células do baço, da mama, de melanoma, de leucemia e linfócitos B e T). É por isso considerado um composto muito promissor (Garcia et al., 2018b; Hussein, 2018; Wellsow et al., 2006).

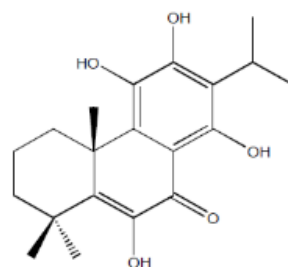


Figura 13 - Estrutura química do composto coleona U (Abdel-Mogib et al., 2002).

A sua estrutura degrada-se facilmente por oxidação, dando origem à coleona-U-quinona que também possui propriedade citotóxica (Garcia et al., 2018b).

A coleona C (**Figura 14**), um outro abietano deste grupo, presente por exemplo na espécie *P. edulis* é outro bom exemplo das vantajosas propriedades dos compostos deste grupo. Apresenta a capacidade de inibir a proliferação e crescimento de várias linhas celulares tumorais, sendo mais eficaz em células de melanoma, leucemia mielóide e cancro gástrico. Atua induzindo a morte celular por apoptose e apresenta baixa toxicidade (Garcia et al., 2018b; González, 2015). Num modelo de cancro do pulmão, a Coleona C permitiu reduzir o tamanho do tumor em $48.9 \pm 14.3\%$ (Garcia et al., 2018b).

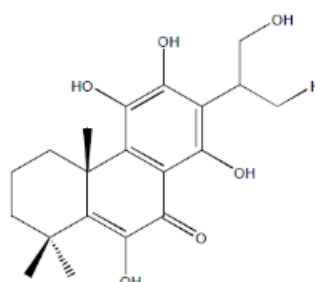


Figura 14 - Estrutura química do composto coleona C (Garcia et al., 2018b).

2.4.1.2.1.e) Abietanóides fenólicos

Os abietanóides fenólicos já demonstraram atividade antimicrobiana contra estirpes de SARM (Rijo et al., 2013a). Apresentam ainda propriedades antioxidante, antimicrobiana, citotóxica, anti-tumoral e anti-VIH (Radulović, Denić, & Stojanović-Radić, 2010).

Um exemplo de um composto deste grupo é o ferruginol (**Figura 15**), isolado, por exemplo, da espécie *P. barbatus* (Alasbahi & Melzig, 2010). O ferruginol é o abietano fenólico mais simples e existe em outras famílias do reino *plantae* para além da família *Lamiaceae*. Este composto já demonstrou um efeito gastroprotetor e de aceleração de recuperação de úlceras, em modelos animais com lesões gástricas induzidas. Este efeito resulta da sua capacidade de aumentar o conteúdo de prostaglandinas gástricas, estimular a proliferação celular e ser antioxidante. O ferruginol também já demonstrou atividade citotóxica, por indução de apoptose, contra cancro da próstata, do pâncreas e leucemia. Manifesta ainda atividade contra a malária, atividade anti-inflamatória e cardioatividade (González, 2015).

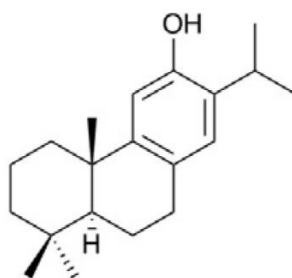


Figura 15 - Estrutura química do composto ferruginol (González, 2014).

Existem outros metabolitos fenólicos comuns relacionados com o ferruginol, como o sugiol, também presente por exemplo na espécie *P. barbatus* (Alasbahi & Melzig, 2010; González, 2015). O sugiol (**Figura 16**) apresenta atividades antimalárica (contra várias estirpes de *Plasmodium falciparum*), antimicrobiana, anti-inflamatória potente, hepatoprotetora, citotóxica, entre outras. (Garcia et al., 2018b; Naghibi et al., 2014).

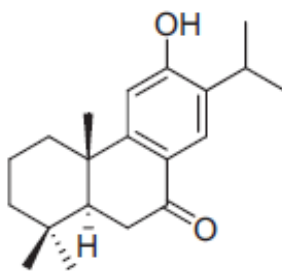


Figura 16 - Estrutura química do composto sugiol (Simões et al., 2010b).

2.4.1.2.1.f) Abietanóides diméricos

A grandidona A (**Figura 17**) é um exemplo de um abietanóide dimérico presente nos extratos de algumas espécies de *Plectranthus* que, tal como outros abietanóides diméricos, possui moderada atividade citotóxica e anti-proliferativa contra várias linhas celulares humanas de cancro (Wang et al., 2013).

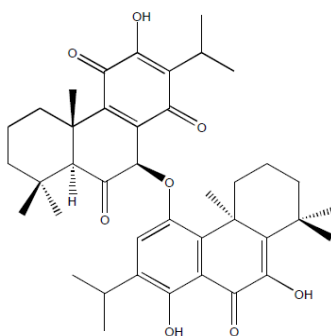


Figura 17 - Estrutura química do composto grandidona A (Abdel-Mogib et al., 2002).

2.4.1.2.1.g) Quinonas estendidas

Este grupo de compostos, tem como exemplo o composto (16S)-coleona E (**Figura 18**) que já demonstrou possuir atividade antimicrobiana (Abdel-Mogib et al., 2002). Outros compostos deste grupo, também encontrados nas plantas *Plectranthus*, possuem atividade inibidora da acetilcolinesterase e atividade antioxidante (Falé et al., 2009; Figueiredo et al., 2010).

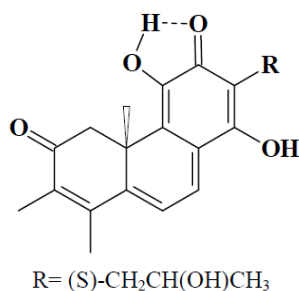


Figura 18 - Estrutura química do composto (16S)-coleona E (Abdel-Mogib et al., 2002).

2.4.1.2.1.h) 1,4- fenantraquinonas

As fenantraquinonas inibem a formação de NO (monóxido de azoto) (Taguchi et al., 2001) e existem derivados destas que apresentam várias atividades terapêuticas (Sarkar, Das, & Kar, 2018).

As plectrantonas A, B, C, D, E (**Figura 19**) são exemplos de compostos pertencentes ao grupo das fenantraquinonas (Abdel-Mogib et al., 2002; Kovács, Vasas, & Hohmann, 2008).

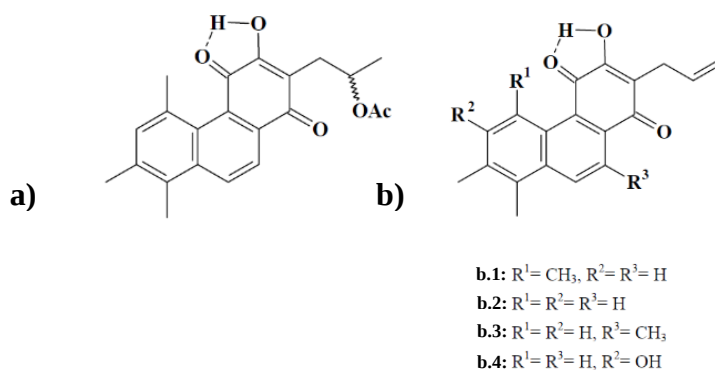


Figura 19 - Estruturas químicas de 1,4 – fenantraquinonas **a)** plectranton B e **b)** **b.1:** plectranton A; **b.2:** plectranton C; **b.3:** plectranton D e **b.4:** plectranton E (Abdel-Mogib et al., 2002).

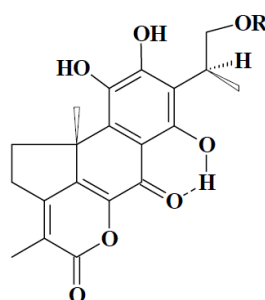
As plectrantonas apresentam uma marcada inibição do crescimento de linhagens celulares dos cancros colorretal e hepatocelular (Orabi et al., 2015).

O seu potencial não terá ainda sido suficientemente investigado pelo que é um grupo de abietanos relativamente pequeno (Kovács et al., 2008; Tóth, Hohmann, & Vasas, 2018).

2.4.1.2.1.i) Abeo-acil-hidroquinonas

Os compostos hidroquinonas já demonstraram possuir as propriedades citotóxica e antioxidante (Dandawate, Vyas, Padhye, Singh, & Baruah, 2010). No entanto, após pesquisa bibliográfica compreendeu-se que a informação quanto à bioatividade deste grupo de compostos é escassa.

Na **Figura 20** está presente um exemplo de um composto deste grupo que já foi isolado da espécie *P. edulis*, a edulona A (Abdel-Mogib et al., 2002).



D118; R= Ac

Figura 20 - Estrutura química do composto edulona A (Abdel-Mogib et al., 2002).

2.4.1.2.1.j) Seco-abietanóides

Alguns *seco*-abietanóides e rearranjos das suas estruturas já demonstraram atividade antituberculosa e atividade citotóxica (Chang et al., 2005; Chen, Wu, Peng, Chen & Chu 2009).

A nafetoquinona (**Figura 21**) é um exemplo de um *seco*-abietanóide já isolado de espécies de *Plectranthus* (Abdel-Mogib et al., 2002; Ladeiras et al., 2016).

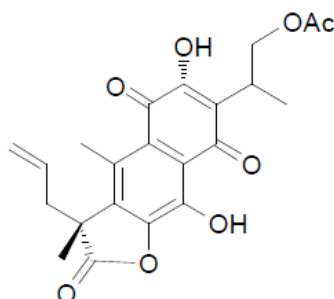


Figura 21 - Estrutura química do composto nafetoquinona (Abdel-Mogib et al., 2002).

Derivados da nafetoquinona já terão demonstrado, *in vitro*, atividade antifúngica (por exemplo contra *Candida krusei* e *Saccharomyces cerevisiae*) (Sasaki, Abe, & Yoshizaki, 2002), propriedade anti-malária (Fieser et al., 1948) e propriedade citotóxica (Hayashi, Smith, & Lee, 1987).

Além dos abietanos existem outros diterpenos que também demonstram propriedades relevantes (Gaspar-Marques, Simões, & Rodríguez, 2004; Hussein, 2018).

2.4.1.2.2 Filocladanos

Este grupo de compostos já demonstrou capacidade de inibir a proliferação de linhas celulares de leucemia (Kulkarni et al., 2012) e um exemplo de um composto, deste grupo, já isolado de espécies *Plectranthus* é o (16R)-17,19-Diacetoxi-16-hidroxi-13 β -cauran-3-ona (**Figura 22**) (Abdel-Mogib et al., 2002).

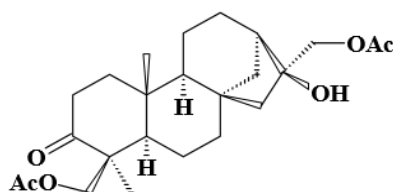


Figura 22 - Estrutura química do composto (16R)-17,19-Diacetoxi-16-hidroxi-13 β -cauran-3-ona (Abdel-Mogib et al., 2002).

2.4.1.2.3 Cauranos

Os cauranos, compostos diterpenos tetracíclicos (Garcia et al., 2018b), possuem propriedades anti-inflamatória, anti-tumoral (Lee, Koo, Hwang & Lee, 2002; Gaspar-Marques, Simões, Valdeira, & Rodríguez, 2008), neuroprotetora (Qi et al., 2018), e anti-viral. Por exemplo o ent-16-cauren-19-ol e o ácido ent-16-cauren-19-óico (**Figura 23**), diterpenos cauranos já isolados da espécie *P. strigosus*, revelaram atividades anti-HSV-1 e anti-HSV-2 (Gaspar-Marques, Simões, Valdeira, & Rodríguez, 2008).

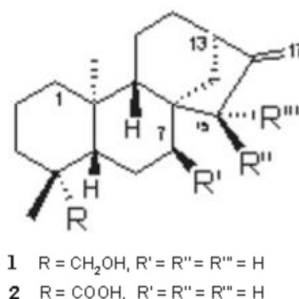


Figura 23 – Estrutura química dos compostos ent-16-cauren-19-ol (**1**) e ácido ent-16-cauren-19-óico (**2**) (Gaspar-Marques et al., 2008).

2.4.1.2.4 Labdanos

Os labdanos possuem estruturas bicíclicas dos quais é exemplo a forscolina (**Figura 24**). A forscolina é constituinte maioritário do extrato da espécie *P. barbatus* e um dos seus usos etnobóticos é o alívio de distúrbios digestivos. (Garcia, et al., 2018b; Lukhoba et al., 2006; Rijo et al., 2005).

A forscolina apresenta propriedades antitumoral (capacidade de impedir a metastização no pulmão) (Saeed, Meyer, Hussein, & Efferth, 2016), cardiotônica, broncodilatadora, anti-hipertensora, anti-inflamatória e antiagregante plaquetária. Trata-se de um composto cuja síntese e reatividade química têm sido extensivamente estudadas (Rijo et al., 2013a; Lukhoba et al., 2006).

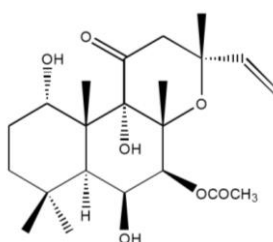


Figura 24 – Estrutura química do composto forscolina (Garcia et al., 2018b).

2.4.1.2.5 Clerodanos

Os clerodanos possuem estruturas bicíclicas (**Figura 25**) (Garcia et al., 2018b) e alguns podem ser encontrados, por exemplo, na espécie *P. ornatus*, como o plectronatim (Rijo et al., 2002). Já demonstraram possuir atividade antimicrobiana baixa a moderada contra espécies de *Candida* e contra estirpes Gram-positivas e Gram-negativas específicas (Rijo et al., 2007; Rijo

et al., 2002). São ainda conhecidos pela sua atividade inseticida moderada (Merritt & Ley, 1992).

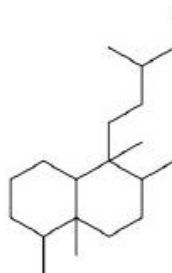


Figura 25 – Estrutura química do esqueleto clerodano (Roncero, Tobal, Moro, Díez & Marcos, 2018).

2.4.1.2.6 Halimanos

Os diterpenóides com o raro esqueleto halimano, constituem um pequeno grupo de produtos naturais, que estruturalmente podem ser considerados como estando entre os diterpenos labdanos e clerodanos (**Figura 26**) (Roncero et al., 2018).

Apresentam uma estrutura bicíclica e possuem várias bioatividades como: atividade anti tumoral, repelente de mosquitos, atividade antimicrobiana, biomarcadores da tuberculose entre outras. Uma das suas fontes é a espécie *P. ornatus* (Hussein, 2018; Rijo, Rodriguez, Duarte & Simões, 2011; Roncero et al., 2018).

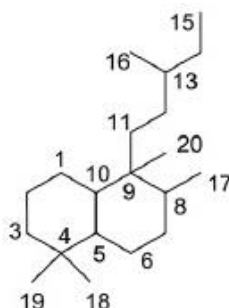


Figura 26 – Estrutura química do esqueleto halimano (Roncero et al., 2018).

2.4.1.2.7 Pimaranos

O pimarano apresenta uma estrutura tricíclica (Garcia et al., 2018b) e por exemplo o 15,16-epoxi-7 α -hidroxipimar-8,14-eno (**Figura 27**), pertencente a este grupo, possui atividade

moderada contra estirpes de SARM e contra *S. aureus* multirresistentes a fármacos (Rijo et al., 2013a).

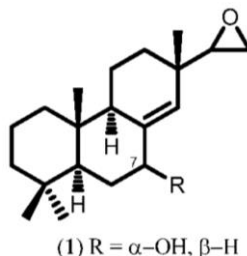


Figura 27 – Estrutura química do composto 15,16-epoxi-7 α -hidroxipimar-8,14-eno (Rijo et al., 2013a).

2.4.1.2.8 Beieranos

Os compostos beieranos possuem atividade inseticida e estão presentes em plantas do género *Plectranthus*, apesar de pouco frequentes, como por exemplo o ácido ent-7 α acetoxi-15-beieren-18-óico (**Figura 28**) (Rijo et al., 2005; Simões et al., 2010b; Wellsow et al., 2006).

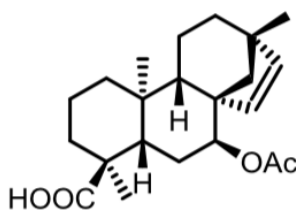


Figura 28 – Estrutura química do composto ácido ent-7 α acetoxi-15-beieren-18-óico (Simões et al., 2010b).

2.4.1.3 Triterpenos

Os compostos do grupo dos triterpenos existem apenas nas plantas (Gabay et al., 2010). Já demonstraram possuir um vasto espectro de atividades: antitumoral (Wu et al., 2013), antimicrobiana (Nascimento et al., 2017), anti-inflamatória, anticonvulsivante, entre outras (Chaturvedi et al., 1976). No género *Plectranthus* foram encontrados e isolados, principalmente, triterpenos vulgares na natureza, como o ácido ursólico, o ácido oleanólico, a betulina e o ácido betulínico (Li, Guo, & Yang, 2002; Odjakova, Popova, Sharif, & Mironova, 2012; Xu, Su, & Zang, 2012).

Os ácidos ursólico e oleanólico são dos compostos mais comuns presentes em plantas do género *Plectranthus* (Rijo et al., 2005). O ácido ursólico possui atividade antimicrobiana

(contra *S. aureus*, organismos Gram negativos como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) (Zaletova et al., 1987), propriedades anti-inflamatória, antimetastática e antiangiogénica (Ludwiczuk et al., 2017). O ácido oleanólico já demonstrou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* sensíveis à meticilina, *B. subtilis* e estirpes de SARM (Sun, Fang, Wang, & Hu, 2006).

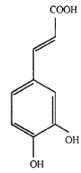
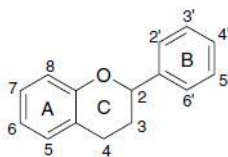
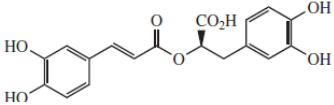
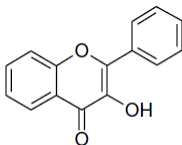
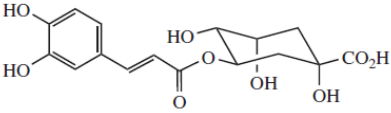
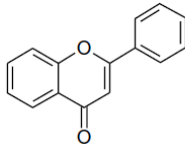
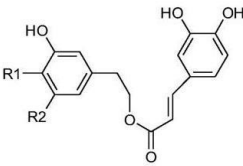
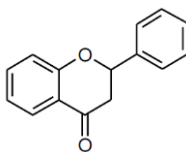
2.4.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são frequentemente encontrados em plantas da família *Lamiaceae*, particularmente nas plantas do género *Plectranthus*, (Aprotosoie, Răileanu, Trifan, & Cioanca, 2013) e apresentam-se como compostos interessantes quer pela proteção que conferem às plantas onde existem, contra agentes patogénicos, radiação ultravioleta e oxidantes (Bahadoran, Mirmiran, & Azizi, 2013), quer pela forte atividade antioxidante que possuem (Orhan et al., 2007). Esta propriedade antioxidante justifica, em parte, o facto destes compostos terem também atividades anti-inflamatória, antitumoral, antiaterosclerótica, cardiovascular e um potencial efeito em doenças neurodegenerativas relacionadas com o envelhecimento, como Parkinson ou doença de Huntington (Bahadoran, Mirmiran, & Azizi, 2013; Bhatt, Mishra, & Bansal, 2013). Devido ao facto dos compostos fenólicos protegerem as células da lesão oxidativa, diminuindo o risco de doenças relacionadas com o *stress* oxidativo, os alimentos onde estão presentes (frutos, vegetais e bebidas como o vinho tinto) são muito benéficos para a saúde (Ramu, Mohan, Jayaveera, Dhanapal, & Senthilkumar, 2012).

Os compostos fenólicos dividem-se em: ácidos fenólicos (ácidos cafeíco, considerado o mais comum dos compostos fenólicos, rosmarínico e clorogénico e os derivados tipo éster, nepetoidina A e nepetoidina B) e flavonóides (flavonas, flavanonas e flavonóis) (Dewick, 2009; Kubínová et al., 2013; Martens & Mithöfer, 2005; Rice-evans, Miller, & Paganga, 1996).

Os grupos e respetivos compostos encontram-se organizados na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Compostos fenólicos com as respetivas estruturas químicas.

Compostos fenólicos	
Ácidos fenólicos	Flavonóides
Ácido cafeico 	Estrutura padrão dos flavonóides 
Ácido rosmarínico 	Flavonóis 
Ácido clorogénico 	Flavonas 
Derivados tipo éster  Nepetoidina A: R1 = H e R2 = OH Nepetoidina B: R1 = OH e R2 = H	Flavanonas 

(Dewick, 2009; Kubínová et al., 2013; Martens & Mithöfer, 2005; Rice-Evans et al., 1996).

A nepetoidina B possui potente atividade antioxidante e a nepetoidina A e B já demonstraram atividade antifúngica (Grayer et al., 2003).

Os flavonóides, como as flavonas (inexistentes em algumas espécies *Plectranthus*), e os flavonóis (Grayer et al., 2010), possuem propriedades anticancerígenas, inclusive em baixas concentrações, e potente atividade na eliminação de radicais livres (Greenwell & Rahman, 2015).

Os principais compostos fenólicos identificados nos extractos de *Plectranthus* são o ácido rosmarínico e o ácido clorogénico (Prasad, Karthikeyan, Karthikeyan, & Reddy, 2011; Ramu et al., 2012).

Os compostos apresentados, terpenos e compostos fenólicos, são exemplos dos muitos com atividades farmacológicas relevantes que podem constituir as plantas do género *Plectranthus* (Hussein, 2018; Ladeiras et al., 2016).

Devido às muitas potencialidades que apresentam e a todos os usos etnobotânicos que possuem, de acordo com Rice, as *Plectranthus* podem ser consideradas “*a plant for the future*” (Rice et al., 2011; p.953).

2.5 Espécies de plantas estudadas

Neste trabalho foram estudadas cinco plantas do género *Plectranthus*: *P. mutabilis*, *P. ciliatus*, *P. lucidus*, *P. xerophilus* e *P. crassus*.

2.5.1 *Plectranthus mutabilis* Codd

Nativa da África do Sul a espécie *P. mutabilis* foi descrita pela primeira vez por L. E. Codd (Codd, 1975).

É uma erva suculenta que possui células preparadas para reter água, permitindo-lhe adaptar-se a ambientes secos (Codd, 1975; Jaarsveld, 1981).

Apresenta um caule rastejante com cerca de 40 cm de comprimento, pouco ramificado e com pilosidades. As suas flores são de tons azuis púrpura a lilás e as folhas são profundamente dentadas, com dentes redondos e podem ser escamosas ou peludas (Codd, 1975; Jaarsveld, 1981).

Algumas das características, referidas, podem ser visualizadas na **Figura 29**.



Figura 29 - Espécie *P. mutabilis* com flôr (fonte: <https://www.inaturalist.org/observations/10947443>, consultado em 06/10/2018).

A espécie *P. mutabilis* não apresenta nomes sinónimos (fonte: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-158334>, consultado em 14/10/2018) e, atualmente, é utilizada para fins ornamentais em jardins, para cobertura de solos e em jardins *Bushveld* (jardins da savana) (Rice et al., 2011).

Descobriu-se que na composição do seu extrato existe nepetoidina A e nepetoidina B (Grayer et al., 2003) e já foi pesquisada a presença de flavonóides, cuja existência não foi confirmada (Grayer et al., 2010). Não foram, ainda, isolados ou identificados diterpenóides nesta espécie e já foi testada contra as bactérias *B. subtilis* e *P. syringae* cujo crescimento não inibiu (Wellsow et al., 2006).

2.5.2 *Plectranthus ciliatus* E. Mey. ex Benth.

Também conhecida como “planta do dinheiro”, a *P. ciliatus* é, à semelhança de outras plantas do género *Plectranthus* um arbusto perene, nativo do sudeste e do sul de África (Sierra-Pérez, González-Canavaciolo, Marrero-Delange, & Rodríguez-Leyes, 2012). É uma dicotiledónia relativamente comum e muito difundida pelo mundo. Possui uma altura máxima de 0,60 m e cresce ao longo do solo (<http://pza.sanbi.org/plectranthus-ciliatus>, consultado a 31/01/2019). A espécie *P. ciliatus* possui um nome sinónimo, *P. natalensis* Bak (Lukhoba et al., 2006).

As suas flores (**Figura 30**) de cor branca a violeta, surgem no final do inverno, são das maiores no género *Plectranthus* e possuem estames compridos (<http://pza.sanbi.org/plectranthus-ciliatus>, consultado a 31/01/2019).



Figura 30 - Flôr da espécie *P. ciliatus* (Fonte: <http://pza.sanbi.org/plectranthus-ciliatus>, consultado a 31/01/2019; <https://www.naturalista.mx/taxa/405011-Plectranthus-ciliatus>, consultado em 06/10/2018).

O seu pecíolo e o seu caule (**Figura 31**) possuem cílios, característica que lhe confere o nome “ciliatus” (<http://pza.sanbi.org/plectranthus-ciliatus>, consultado a 31/01/2019).



Figura 31 - Caule da espécie *P. ciliatus* coberto de cílios roxos (fonte: <http://pza.sanbi.org/plectranthus-ciliatus>, consultada a 02/02/2019).

As folhas (**Figura 32**) são ovais em forma de lâmina, com corte serrilhado, brilhantes, peludas e roxas no verso (http://pza.sanbi.org/plectranthus-ciliatus, consultado a 31/01/2019; Bercu, 2013).



Figura 32 - Folhas da espécie *P. ciliatus* (fonte: <http://pza.sanbi.org/plectranthus-ciliatus>, consultada 02/02/2019; <https://www.naturalista.mx/taxa/405011-Plectranthus-ciliatus>, consultada a 02/02/2019).

Esta espécie aprecia ambientes húmidos, pelo que cresce em solo molhado livre de geada e com sombra, e é comumente encontrada nas florestas de KwaZulu-Natal e de Suazilândia (sul de África) (<http://pza.sanbi.org/plectranthus-ciliatus>, consultado a 31/01/2019; Potgieter, 2009, p.139). É inclusive considerada uma praga na Nova Zelândia, estando na lista da *Regional Surveillance Plant Pest* (Rice et al., 2011).

Já se realizou a sequenciação de certas regiões do ADN desta espécie com o objetivo de determinar a sua filogenia com maior precisão. Observou-se que dentro da subtribo

Plectranthinae, a espécie em questão encontra-se no género *Plectranthus* e não no *Coleus* (Paton et al., 2004; Paton et al., 2018).

A espécie *P. ciliatus* é usada na higiene pessoal, para lavar roupas, peles de animais e animais. Pelo facto de serem plantas atraentes são usadas para decoração de jardins e para cobertura de solos, formando densas carpetes debaixo das árvores. São também usadas como materiais e são plantadas na Ásia, África, Europa, Austrália e América (Hitchcock, 1990; Lukhoba et al., 2006; Rabe & Van Staden, 1998; Rice et al., 2011).

O extrato desta planta já demonstrou ser um promissor anti-VIH e é usado por algumas tribos em misturas medicamentosas, no alívio dos sintomas causados pelo vírus (Kapewangolo, 2013, p.23,49; Semenya, Potgieter, & Erasmus, 2012, 2013). Possui propriedade citotóxica e potente capacidade indutora de morte celular, nomeadamente contra células de adenocarcinoma do colo do útero e contra linhas celulares de leucemia (Le Roux, Prinsloo, & Meyer, 2015; Saeed et al., 2016). Já revelou, também, propriedade antimicrobiana, nomeadamente contra *S. aureus* e *B. subtilis* (Rabe & Van Staden, 1998) e propriedade anti-inflamatória (Minker, Sheridan et al., 2007).

Esta planta é uma boa fonte de diterpenos do tipo abietano, cauranos e labdanos, sendo, os cauranos, os seus principais constituintes. O caurano, ácido caurénico, isolado desta planta já demonstrou atividade antibacteriana moderada contra *S. aureus*, estirpes de *S. aureus* multirresistentes, inclusive SARM, e estirpes de *Mycobacterium* com crescimento rápido (Garcia et al., 2018b; Stavri & Gibbons, 2007).

No extrato da espécie *P. ciliatus* já foi identificada a presença de flavonóides, como as flavanonas e flavonas (Grayer et al., 2010), derivados tipo éster (Grayer et al., 2003) e antocianinas como a peonidina 3-(6''-caffeoil- β -glucopiranosida)-5- β -glucopiranosida. As antocianinas apresentam-se em maior quantidade ao nível dos cílios do caule e a sua função é a de proteção da planta (Jordheim et al., 2016).

Dos seus óleos essenciais isolaram-se e indentificaram-se compostos como: Limoneno, β -Cariofileno, Ledol e T-Cadinol (Viljoen et al., 2006).

Já foram identificados híbridos naturais desta planta com a espécie *P. zuluensis*, nos quais se identificou a presença de terpenóides (Rice et al., 2011).

2.5.3 *Plectranthus lucidus* (Benth.) Van Jaarsv. & T.J.Edwards

A espécie *P. lucidus* ou *P. strigosus* var. *lucidus* Benth. (fonte: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-345275>, consultado em 29/01/2019) é uma espécie resistente, anual e perene que surge nos pisos das florestas semi-secas, com um crescimento rápido e que atinge uma altura de 150 mm (Jaarsveld & Ards, 1997; Jaarsveld, 2006; Rice et al., 2011).

Foi primeiramente descrita em 1848 por George Bentham como *P. strigosus* var. *lucidus*. O nome “lucidus” significa brilhante e refere-se ao aspeto lustroso das folhas desta planta (Jaarsveld & Ards, 1997; Jaarsveld, 2006).

É endêmica na África do Sul, mais precisamente no Cabo oriental, e tem preferência por ambientes com sombra ou ambientes sem luz solar direta. No entanto, apresenta uma natureza camaleónica adaptando-se a qualquer condição ambiental. Por exemplo, as suas folhas podem mudar de tamanho de modo a permitir uma adaptação à intensidade da luz e produzem uma substância, antocianina, de coloração roxa, que bloqueia a luz solar intensa e que também surge quando o ambiente se encontra muito seco. Apesar das suas capacidades adaptativas *P. lucidus* não é inteiramente tolerante ao ambiente seco, necessita de água no verão e não tolera a geada (Jaarsveld & Ards, 1997; Jaarsveld, 2006).

As suas folhas (**Figura 33**), de aspeto característico brilhante, dispõem-se de forma oposta ao longo do caule, possuem veias proeminentes, um formato oval com margens dentadas e no seu verso são ligeiramente peludas (Jaarsveld & Ards, 1997; Jaarsveld, 2006).



Figura 33 - Folhas da espécie *P. lucidus* (fonte: <http://pza.sanbi.org/plectranthus-lucidus>, consultado a 29/01/19).

O caule desenvolve-se ao longo do solo, é arroxeadado a verde, de forma quadradada e coberto por pêlos muito finos (Jaarsveld & Ards, 1997; Jaarsveld, 2006).

As flores (**Figura 34**), surgem no outono, são tubulares, com um estreito tubo de corola, curtas e com um lábio inferior em forma de barco (Jaarsveld & Ards, 1997; Jaarsveld, 2006).



Figura 34 - Flores da espécie *P. lucidus* (fonte: <https://www.inaturalist.org/observations/11110298>, consultado em 06/10/2018; <http://pza.sanbi.org/plectranthus-lucidus>, consultada a 29/01/19).

A espécie *P. lucidus* de flores brancas, com folhagem verde pálida, é denominada de *P. lucidus* “Albert” (**Figura 35**) e a de flores lilás, com tons púrpura em partes do caule, é denominada *P. lucidus* “Bulolwe” (**Figura 36**) (Jaarsveld & Ards, 1997; Jaarsveld, 2006).



Figura 35 - Espécie *P. lucidus* “Albert” (fonte: <https://www.inaturalist.org/observations/11110298>, consultado em 06/10/2018).



Figura 36 - Espécie *P. lucidus* “Bulolwe” (fonte: <http://pza.sanbi.org/plectranthus-lucidus>, consultada a 29/01/2019).

Esta planta é utilizada como planta de vaso em interiores, pendurada em cestos para decoração, como cobertura de solos, em jardins *waterwise*, jardins de rochas e jardins subtropicais (Rice et al., 2011).

Esta espécie possui efeito terapêutico em patologias gastrointestinais, atividade antimicrobiana no tratamento de ferimentos, capacidade de aliviar condições respiratórias e propriedade antimalária (Babiaka et al., 2015). O extrato de *P. lucidus* já terá demonstrado atividade contra micro-organismos como a bactéria *Xanthomonas campestris* (Gurlal, 2005, p.99).

Quanto à fitoquímica desta espécie, de acordo com a pesquisa bibliográfica efetuada, já se isolaram os compostos apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Compostos e respectivos grupos químicos isolados da espécie *P. lucidus*.

Grupos químicos	Compostos
Derivados tipo éster ¹	Nepetoidina A e B
Abietanos ^{2,3,4}	Parviflorona A, B, C, D, E, F, G, H, 11-hidroxi-2 α -(4-hidroxibenzoiloxi)-abieta-5,7,9(11),13-tetraen-12-ona 11-hidroxi-2-(4-hidroxibenzoil)-5,7,9(11),13-abietatetraen-12-ona 11-hidroxi-19-(3-metil-2-butenoil)-5,7,9(11),13-abietatetraen-12-ona Hinoquiol
Cauranos ^{5,6}	ent-16-cauren-19-ol, ácido ent-16-cauren-19-óico, ácido xilópico e ácido xilópico
Sesquiterpenos ^{5,6}	4 β ,6 β -dihidroxi-1 α ,5 β (H)-guai-9-eno e 4 β ,6 β -dihidroxi-1 α ,5 β (H)-guai-10(14)-eno
Outros ^{5,6}	Misturas de hexacosano-1,26-diol e de diésteres de ferrulato octacosan-1,28-diol Ésteres de ácido ferulico Ácidos e álcoois gordos 2-(4-hidroxifenil)-etanol

(¹ Grayer et al., 2003; ² Gaspar-Marques et al., 2008; ³ Gurlal, 2005, p.99; ⁴ Wang et al., 2015; ⁵ Gaspar-Marques et al., 2008; ⁶ Hussein, 2018).

Relativamente a estes compostos muitas das suas bioatividades já foram identificadas e algumas delas encontram-se descritas na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Compostos, já isolados e identificados, presentes no extrato da espécie *P. lucidus* e respectivas bioatividades.

Compostos presentes no extrato da espécie <i>P. lucidus</i>	Bioatividades
ent-16-cauren-19-ol e ácido ent-16-cauren-19-óico	Anti-herpética ¹
Parviflorona F	Antioxidante ² ; Atividade contra a <i>M. tuberculosis</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> ³ ; Atividade antiproliferativa seletiva em células de câncer da mama, carcinoma do pulmão, entre outras e em células tumorais com sobreexpressão da glicoproteína P ⁴
Parviflorona E	Antioxidante ¹
11-hidroxi-2 α -(4-hidroxibenzoiloxi)-abieta-5,7,9(11),13-tetraen-12-ona	Diminui os níveis de β -hematina ⁵
11-hidroxi-19-(3-metil-2-butenoil)-5,7,9(11),13-abietatetraen-12-ona	Moderada atividade antifúngica ⁶
11-hidroxi-2-(4-hidroxibenzoil)-5,7,9(11),13-abietatetraen-12-ona	Atividade contra os fungos <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotonia sclerotiorum</i> e <i>Fusarium oxysporum</i> ⁶
Compostos de mistura de hexacosano-1,26-diol e diésteres de ferrulato octacosan-1,28-diol	Antioxidante ⁷
Hinoquiol	Anti-tumoral (contra linhas celulares do carcinoma cervical e humano do ovário); antioxidante; capacidade de inibir a produção de enzimas pró-inflamatórias como a 5-lipo-oxigenase; estimula a produção de óxido nítrico e do fator de necrose tumoral α ; hepatoprotetor; capacidade de inibir canais de sódio de alta voltagem ⁸

(¹ Hussein, 2018; ² Narukawa, Shimizu, Shimotohno, & Takeda, 2001; ³ Rijo et al., 2013a; ⁴ Garcia et al., 2018b; Saito, Goto, & Nakagawa-Goto, 2018; ⁵ Ntie-Kang et al., 2013; ⁶ Gurlal, 2005, p.99; ⁷ Gaspar-Marques et al., 2008; ⁸ Fan et al., 2012; Wang et al., 2015).

Neste extrato já foi pesquisada a presença de flavonóides que não se terá confirmado (Grayer et al., 2010).

A hibridização nesta espécie é difícil de ocorrer no entanto, já se indentificou um híbrido natural entre as espécies *P. lucidus* e *P. hilliardiae* (Brits et al., 2001; Potgieter, 2009, p.80-84).

2.5.4 *Plectranthus xerophilus* L. E. Codd

A palavra xerófilo significa “ama o seco” e por isso denomina-se xerófilo um organismo que se adapta bem a locais secos (<https://candide.eu/ZA/plants/eaabf98455d9bdfef9c454fdb2d5b7f9>, consultado a 04/11/2018).

A espécie *P. xerophilus* foi descrita em meados de 1997 e é um arbusto atraente, ereto, de folha perene, originário do sul de África, mais exatamente de Steelpoort, uma cidade mineira na província de Limpopo. Tem um cheiro intenso, cresce em solos de areia ou barro, pode atingir até 1-1,7 metros de altura e é uma planta dicotiledónea (<https://candide.eu/ZA/plants/eaabf98455d9bdfef9c454fdb2d5b7f9>, consultado a 04/11/2018; Mottram, 2014; Codd, 1975).

Os seus frutos surgem no outono e as suas flores nascem do outono para o inverno. As flores dispõem-se em cachos com até 35 cm de comprimento, a corola tem um tom violeta a roxo escuro, de forma sigmóide. São bilabiais, com um lábio superior e um lábio inferior, em que o superior é mais curto e em forma de capuz e o inferior, mais comprido, em forma de barco (Codd, 1975; Foden & Potter, 2005).

As folhas são grandes de forma ovada a elíptica. Apresentam uma camada de pêlos lanosos e esbranquiçados que confere às folhas um tom verde-cinza e permite que a planta não perca demasiada água através da transpiração e esteja mais protegida dos raios solares e ventos frios (Codd, 1975; Foden & Potter, 2005).

O caule desta planta possui, também, a camada de pêlos, tem uma forma cilíndrica, com nervuras e é fino (Codd, 1975; Foden & Potter, 2005).

É possível observar a planta na **Figura 37**.



Figura 37 – Espécie *P. xerophilus* (fonte: <https://candide.eu/ZA/plants/eaabf98455d9bdfef9c454fdb2d5b7f9>, consultado em 06/10/2018; http://plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=284147, consultado a 07/11/2018).

As raízes grossas de aspeto tubular horizontais, também ajudam a planta a ser resistente a ambientes secos e por isso pode ser colocada em locais com sombra parcial ou totalmente ao sol e torna-se uma excelente escolha para jardins *waterwise*. (Codd, 1975; Foden, & Potter, 2005).

Ter-se-á ponderado colocar esta espécie enquanto um subgénero das *Plectranthus* devido às suas características tão próprias. No entanto pelo facto do género *Plectranthus* ser tão amplo e apresentar vários sub-grupos com diferentes características, não foi necessário (Codd, 1975). Esta espécie já terá sido sequenciada em determinadas regiões do seu ADN, de modo a analisar mais facilmente a sua filogenia. Como tal, neste momento, esta espécie encontra-se na subtribo *Plectranthinae*, no género *Coleus* (Paton et al., 2004; Paton et al., 2018).

A espécie *P. xerophilus* não apresenta nomes sinónimos (fonte: www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-158602, consultado a 01/11/2018) e na atualidade é usada em jardins *Bushveld* (Rice et al., 2011).

Do seu extrato já terão sido isoladas a nepetoidina A e a nepetoidina B (Grayer et al., 2003). Ainda não se identificaram ou isolaram diterpenóides e já se pesquisou a existência de flavonóides, cuja presença não foi confirmada (Grayer et al., 2010).

2.4.5 *Plectranthus crassus* N. E. Br.

A espécie *P. crassus* é um arbusto nativo da África oriental (por exemplo Malawi, onde é endémica) e da África do Sul e pode surgir em prados e em fendas de rochas, a uma altitude de cerca de 3000 metros (Dombo, Costa, & Neto, 2002; Downes & Darbyshire, 2018).

P. crassus possui poucas ramificações e cresce de 0,5 a 1 metros de altura. O termo “crassus” vem do latim maciço, o que poderá dever-se ao facto dos seus caules serem lenhosos (estarem cobertos por uma camada espessa de madeira e assim possuírem um tecido de suporte). Os caules são curtos e, tal como as folhas, possuem glândulas de cor laranja. As suas raízes crescem debaixo da terra (Downes & Darbyshire, 2018).

As suas flores possuem pedúnculos curtos e apresentam características típicas do género *Plectranthus*. É possível visualizá-las na **Figura 38** (Dombo, Costa, & Neto, 2002; Downes & Darbyshire, 2018).

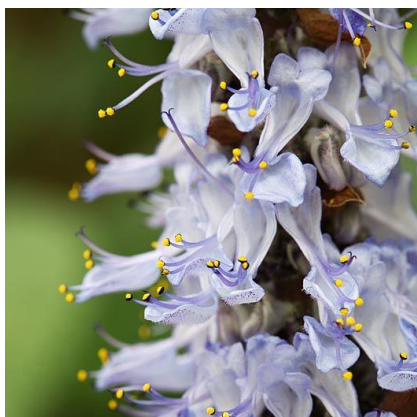


Figura 38 - Espécie *P. crassus* (fonte: <https://www.gapphotos.com/imagedetails.asp?view=plectranthus-crassus-&imagero=112412>, consultado em 06/10/2018).

Esta espécie produz pequenas nozes castanhas ovóides (Downes & Darbyshire, 2018) e não apresenta nomes sinónimos (fonte: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-158006>, consultado a 15/10/2018). Na Hungria, as suas folhas são usadas na culinária como aditivo alimentar (Lukhoba et al., 2006).

Quanto à sua taxonomia, já se realizou a sequenciação de certas regiões do ADN de modo a facilitar a análise da sua filogenia e, consequentemente neste momento, esta espécie da subtribo *Plectranthinae* encontra-se no género *Coleus* (Paton et al., 2004; Paton et al., 2018).

Relativamente à fitoquímica, ainda pouco conhecida, ter-se-á descoberto na constituição do seu extrato os compostos fenólicos, nepetoidina A e nepetoidina B. Efetivamente já demonstrou atividade contra os fungos *Aspergillus niger* e *Cladosporium herbarum* (Grayer et al., 2003). No extrato da espécie *P. crassus* ainda não foi detetada a presença de flavonóides (Grayer et al., 2010) nem isolados ou indentificados diterpenóides (Abdel-Mogib et al., 2002; Hussein, 2018).

Para as diferentes plantas do género *Plectranthus* em estudo, de acordo com a pesquisa bibliográfica efetuada, existem diferenças em relação à quantidade de informação disponível.

3. Ensaios biológicos

Os extratos das plantas estudadas foram preparados e avaliados quanto à sua atividade biológica, nomeadamente, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, toxicidade geral e citotoxicidade.

3.1 Atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigénio (ERO) como o anião superóxido, peróxido de hidrogénio, radical hidróxilo e outros radicais livres (Ray, Huang, & Tsuji, 2012), possuem eletrões desemparelhados, sendo portanto extremamente instáveis (Rijo et al., 2012; Sharma, Jha, Dubey, & Pessarakli, 2012). Estas moléculas instáveis procuram a estabilidade interagindo com macromoléculas biológicas como o ADN, lípidos e proteínas (Ntungwe et al., 2017; Tomei & Salvador, 2005).

As ERO resultam de várias reações metabólicas em organismos aeróbios durante a respiração (Ray et al., 2012). Quando o equilíbrio destas reações sofre alterações e ocorre um aumento na quantidade de ERO, estas podem provocar *stress* oxidativo, levando a lesões celulares e, conseqüentemente, a várias doenças como cancro, diabetes, obesidade, doenças associadas ao envelhecimento, doenças cardiovasculares, entre outras (Nicolai et al., 2016). O atual estilo de vida provoca excesso de produção de radicais livres e ERO, o que contribui para a importância dos antioxidantes para a saúde humana. No entanto, quando presentes no organismo em quantidade saudável, as ERO também desempenham funções relevantes como a defesa contra infeções (Nicolai et al., 2016; Ray et al., 2012; Sharma et al., 2012).

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos pressupõe uma análise qualitativa seguida de uma quantitativa. Ambas podem ser executadas pelo método colorimétrico do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), um radical livre orgânico de cor roxa, muito utilizado como indicador da atividade antioxidante de extratos e óleos vegetais (Alves, David, David, Bahia & Aguiar, 2010; Pires, Torres, Santos & Chow, 2017; Wang, Wu, Shyur, Kuo, & Chang, 2002). O DPPH apresenta a vantagem de ser um radical livre estável e que, na presença de substâncias antioxidantes (dadores de H^+), recebe H^+ e fica reduzido em DPPH-H (Hidrazina). Quando esse processo ocorre, a formulação passa da cor roxa para a cor amarela (**Figura 39**) (Nicolai et al., 2016; Pisoschi, Cheregi, & Danet, 2009).

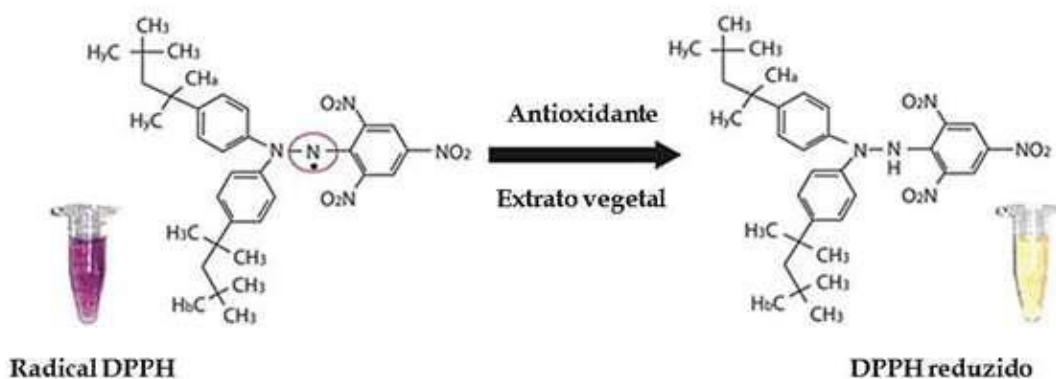


Figura 39 -Redução do DPPH com alteração da coloração da solução de roxo para amarelo (Pires et al., 2017).

Na análise qualitativa, realizada pelo método de descoloração ccd (cromatografia em camada delgada) - DPPH, observa-se a existência e intensidade de uma mancha de cor amarela numa placa de ccd e, conseqüentemente, a existência ou não da capacidade antioxidante. Esta técnica pode ser usada como um método preliminar rápido, para detectar a propriedade da atividade antioxidante em determinados extratos (Nicolai et al., 2016; Rijo et al., 2012; Tomei & Salvador, 2005).

Na análise quantitativa, caso a amostra se tenha demonstrado antioxidante no ensaio qualitativo, utiliza-se o espectrofotômetro para se determinar a absorvância da forma reduzida do DPPH, pois este possui intensa absorção na região visível do espectro (400-750 nm), e assim determinar a atividade antioxidante (Nicolai et al., 2016). Quanto maior a propriedade antioxidante de um extrato mais amarelada é a formulação e menor o valor da absorvância medida, o que reflete maior poder antioxidante da amostra em estudo (Pires et al., 2017).

Existem outros métodos possíveis para a avaliação da capacidade antioxidante de amostras, sendo este dos mais rápidos, reprodutivos, precisos e simples que permite a utilização de pequenas quantidades de amostra, uso de pequenos volumes de reagentes e geração de poucos resíduos (Alves et al., 2010; Pires et al., 2017). No entanto, é um método influenciado: pelo solvente usado (o DPPH deve estar sempre dissolvido em solvente orgânico, como etanol ou metanol); pelo pH; pela concentração das amostras e pelo tempo de reação sendo que a concentração de radical DPPH é inversamente proporcional à concentração do antioxidante testado e ao tempo da reação (Pires et al., 2017; Tomei & Salvador, 2005; Wang et al., 2002).

3.2 Atividade antimicrobiana

O aumento das resistências dos micro-organismos e a consequente diminuição da eficácia dos antimicrobianos conhecidos, são uma ameaça global para a saúde pública. Torna-se, por isso, crucial a procura por novas terapêuticas mais eficazes contra estes agentes patogénicos (Balouiri, Sadiki & Ibnsouda, 2016; Silveira, Olea, Mesquita, Cruz & Mendes, 2009).

A maior parte dos compostos antimicrobianos disponíveis, são produtos provenientes de microorganismos e de plantas. As plantas continuam a fornecer uma vasta gama de distintos e complexos compostos, constituindo uma promissora fonte de pesquisa de antimicrobianos (Balouiri et al., 2016).

Existem vários métodos para realizar o estudo da atividade antimicrobiana em extratos vegetais, entre os quais, o método de difusão em agar. O método de difusão em agar, é um método físico no qual um micro-organismo, inicialmente inoculado num meio, é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido. (Alves et al., 2008; Balouiri et al., 2016; Ostrosky et al., 2008).

O resultado é comparado com um controlo positivo (uma substância padrão) e um controlo negativo (o solvente utilizado para dissolver os extratos). Posteriormente à incubação das placas, é feita a medição do halo de inibição de crescimento. De acordo com a dimensão do halo do extrato, e comparativamente com o halo do controlo positivo, a atividade antimicrobiana do extrato em estudo pode ser alta, significativa, moderada ou baixa. Quanto mais semelhante for o diâmetro do halo do extrato ao diâmetro do halo do controlo positivo, mais ativo é o extrato contra o organismo (Alves et al., 2008; Balouiri, Sadiki & Ibnsouda, 2016; Ostrosky et al., 2008).

Neste método é essencial respeitar um conjunto de condições que influenciam os resultados (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Condições que afetam a suscetibilidade do método de difusão em agar e respectivas particularidades.

Condições que afetam a suscetibilidade do método de difusão em agar	
Temperatura de incubação	Para as bactérias é de 35-37 °C, para os fungos é de 25-27 °C e é muito importante manter a temperatura da estufa homogênea.
Tempo de incubação	Para as bactérias é de 24 a 48 horas e para os fungos é de 48 a 72 horas.
Meio de cultura	Deve proporcionar um crescimento adequado dos organismos em análise e não conter substâncias que contrariem o crescimento microbiano ou contaminações, de modo a não originarem falsos positivos ou falsos negativos; A concentração do meio utilizado tem influência no crescimento microbiano; O pH do meio deve ser compatível com o crescimento microbiano e com a estabilidade e atividade das substâncias testadas, por exemplo o aumento da acidez do meio diminui a atividade bacteriana de substâncias básicas.
Disponibilidade de oxigênio	Deve estar conforme o metabolismo do micro-organismo (aeróbio, anaeróbio ou facultativo) em análise pois a disponibilidade deste gás poderá influenciar na sua multiplicação.
Inóculo	Deve ser padronizado, pois a suscetibilidade dos agentes antimicrobianos depende da quantidade de inóculo.
Espessura e uniformidade do Agar	Caso conforme e uniforme, permite uma melhor leitura do diâmetro do halo.
Assépsia	É importante trabalhar sempre à chama e recorrer a álcool a 70% para que o meio de trabalho seja o mais asséptico possível e assim, consequentemente, os resultados serem os mais corretos possíveis.

(Alves et al., 2008; Silveira et al., 2009; Balouiri et al., 2016; Ostrosky et al., 2008).

O método de difusão em agar permite várias técnicas para a aplicação das amostras nas placas: por meio de disco, por cilindros de aço inoxidável ou por perfuração em agar (poços) (Ostrosky et al., 2008; Silveira et al., 2009).

Neste trabalho será utilizado o método de perfuração em agar (poços) ou método de difusão em poços. Este método é simples, requer relativamente poucos recursos para a sua execução e é o mais sensível comparado com os mencionados anteriormente (Balouiri et al., 2016; Ostrosky et al., 2008).

O método dos poços, é o mais adequado para testar a difusão radial de substâncias e a presença de partículas em suspensão na amostra a ser testada, tem menor probabilidade de interferir com a difusão da substância antimicrobiana, do que no método do disco (Silveira et al., 2009).

Após se constatar que determinado extrato atua contra determinado microorganismo é possível analisar o tipo de inibição que este lhe provoca, através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI), concentração mínima bactericida (CMB) e concentração mínima fungicida (CMF) (Wiegand, Hilpert, & Hancock, 2008).

A CMI é considerada o padrão para determinar a suscetibilidade de certos organismos a antimicrobianos e é também usada para aferir a *performance* de outros testes de suscetibilidade (Andrews, 2001; Balouiri et al., 2016; Jorgensen & Ferraro, 2009). CMI defini-se como a concentração mínima de um antimicrobiano ou amostra que inibe o visível crescimento de um organismo após a incubação deste. Quando outro teste demonstra um resultado interessante relativamente a um micro-organismo, o método CMI pode ser usado para confirmar esse resultado (Figueiredo et al., 2010; Vipra et al., 2013).

CMB defini-se como a concentração mínima de antimicrobiano ou amostra que mata 99,9 % de um organismo bacteriano, previamente desenvolvido durante 24 horas num meio de cultura livre de antibióticos e em condições *standart* (Andrews, 2001; Balouiri et al., 2016; Figueiredo et al., 2010).

Existe ainda a determinação da CMF que é idêntica à CMB mas aplicada aos fungos (Balouiri et al., 2016).

A determinação da CMI é, principalmente, realizada por laboratórios de diagnóstico para confirmar e testar o desenvolvimento de resistências invulgares de micro-organismos (auxiliando na insistente “luta” contra as resistências aos antimicrobianos) e é usado enquanto ferramenta de investigação para determinar a atividade *in vitro* de antimicrobianos (Andrews, 2001; IDEXX Laboratories, 2017). Contribui assim para a escolha de um antibiótico mais apropriado para determinado tratamento, aumentando a probabilidade de sucesso da terapêutica (Figueiredo et al., 2010; Vipra et al., 2013).

Neste trabalho, a determinação da CMI, CMB e CMF foi realizada recorrendo à técnica de microdiluição proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (*Clinical and Laboratory Standards Institute* [CLSI], 2003). Ao realizar estes ensaios recorrendo à técnica de microdiluição é possível economizar espaço, reagentes e meios de cultura, repetir várias vezes o ensaio e analisar diferentes diluições dos extratos em estudo, em apenas uma placa por micro-organismo, aumentando a fiabilidade dos testes (Bona, Pinto, Fruet, Jorge, & Moura, 2014; Jorgensen & Ferraro, 2009).

O método de difusão em poços e o método de microdiluição para a determinação da CMI, CMB e CMF complementam-se nos seus resultados, permitindo uma análise mais detalhada da atividade antimicrobiana das amostras (Andrews, 2001; Balouiri et al., 2016).

3.3 Toxicidade geral

De modo a garantir a segura utilização de determinadas substâncias, é necessário não só comprovar a sua atividade terapêutica, mas também realizar estudos de toxicidade. O método mais conveniente para avaliar esta atividade biológica é recorrendo ao modelo de *Artemia salina* L. (Amarante, Müller, Póvoa, & Dolabela, 2011; Hamidi et al., 2014).

No ensaio da avaliação da toxicidade geral, usando o modelo de *Artemia salina* L., através da adição de determinadas substâncias, é induzido um mecanismo celular que ocorre através de necrose, morte da célula ou apoptose na *Artemia salina* L. Este método estabelece a tolerância destes animais a substâncias químicas, correlacionando a percentagem (%) de morte de *Artemia salina* L., com as concentrações das amostras usadas (Ntungwe et al., 2017).

A *Artemia salina* L. é um crustáceo invertebrado com rápido desenvolvimento, habita apenas em lagos e lagoas com alta salinidade (60 a 300 ppt) e, em condições naturais, alimenta-se de algas, protozoários e detritos. Produzem ovos que flutuam na água e que podem envolver diretamente para náuplios (*Artemia salina* jovem) (**Figura 40**) ou, no caso das condições do meio serem desfavoráveis, evoluir para cistos (formas de vida dormentes) que conseguem sobreviver até 80 anos em condições extremas. Caso as condições do meio melhorem, os cistos revitalizam e evoluem para náuplios (Dumitrascu, 2011; Hamidi et al., 2014; Parra, Yherba, Sardinias, & Buela, 2001).



Figura 40 - Náuplio de *Artemia salina* L. (Hamidi, Jovanova, & Panovska, 2014).

Estes animais são utilizados para tratar doenças como o reumático e para testar amostras pois a resistência destes seres torna-os ideais para realizar testes de toxicidade de vários compostos (Dumitrascu, 2011). Deste modo o modelo de *Artemia salina* L. para avaliação da toxidade geral de compostos apresenta várias vantagens indicadas na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Vantagens do modelo de *Artemia salina* L.

Vantagens do modelo de <i>Artemia salina</i> L.	
Rapidez	A monitorização pode prolongar-se até um máximo de 60 horas, no entanto na maioria dos casos os cálculos da concentração letal a 50% (CL ₅₀) são obtidos após 24h.
Simplicidade	Não é necessário formação especial para o ensaio.
Poucos requisitos	Não necessita de técnicas de assépsia nem de equipamento especial, utiliza quantidades relativamente baixas de amostra e demonstra facilidade na obtenção de um grande número de organismos exatamente da mesma idade e condição fisiológica.
Resistência	Os cistos são comercializados e disponibilizados de forma a que os testes possam ser realizados em todo o mundo, com o mesmo material original e sem qualquer dificuldade de aprovisionamento.
Baixo custo	A quantidade de cistos necessária por teste é muito pequena e não requer a utilização de animais de laboratório.
Alto nível de repetibilidade	Permite que um grande número de amostras sejam testadas e processadas de forma adequada.
Alternativa aos ensaios com animais de laboratório e células <i>in vitro</i>	Devido a questões éticas e económicas, têm-se vindo a observar a tendência para limitar o uso de animais de laboratório em testes toxicológicos. No entanto é necessária a realização de testes <i>in vivo</i> para ser possível extrapolar os dados obtidos para a população humana. Sendo a <i>Artemia salina</i> L. sensível a uma variedade de substâncias e podendo-se considerar o ensaio de toxicidade geral em <i>Artemia salina</i> L. um ensaio <i>in vivo</i> , este torna-se numa alternativa aos ensaios com animais e aos ensaios em células <i>in vitro</i> .

(Dumitrascu, 2011; Hamidi et al., 2014; Parra et al., 2001; Rajabi, Ramazani, Hamidi, & Naji, 2015).

O uso do modelo de *Artemia salina* L. para a avaliação da toxicidade geral, obriga ao cumprimento de vários critérios e condições experimentais de modo a atingir uma ampla aplicabilidade do ensaio, conforme indicado na **Tabela 9** (Hamidi et al., 2014).

Tabela 9 – Critérios e condições experimentais a cumprir no uso do modelo de *Artemia salina* L. para a avaliação da toxicidade geral.

Critérios e condições experimentais no uso do modelo de <i>Artemia Salina</i> L.
Temperatura de 22 a 29 °C para “chocar” os cistos; meios mais quentes impedem o “chocar” dos cistos.
Salinidade de 60 a 300 ppt.
Arejamento constante para uma distribuição homogênea do oxigénio na água.
Fonte de luz para estimular o “chocar” dos cistos.
pH de 8 para “chocar” os cistos.
Cistos provenientes da mesma região geográfica.
Náuplios de <i>Artemia salina</i> L., no início de cada teste, com a mesma idade.
Presença de controlos positivos e negativos para verificação da sensibilidade da <i>Artemia salina</i> L. e da conformidade com o procedimento <i>standart</i> .

(Dumitrascu, 2011; Hamidi et al., 2014; Rajabi et al., 2015).

Mesmo em condições ambientais constantes a sensibilidade da *Artemia salina* L. em diferentes estados de desenvolvimento, difere de estirpe para estirpe e este método não fornece informação adequada quanto ao mecanismo tóxico do extrato em estudo. Em contrapartida fornece dados preliminares de triagem da toxicidade de extratos vegetais que podem ser apoiados por bioensaios mais específicos (Ogbole, Segun, & Adeniji, 2017; Hamidi et al., 2014).

Para as amostras com os valores de morte de *Artemia Salina* L. (%) superiores é determinado o valor da concentração letal a 50% (CL₅₀). No final os extratos com o valor de CL₅₀ mais baixo são considerados os mais tóxicos e os que, posteriormente, podem ser testados quanto à sua citotoxicidade. Compostos e seus derivados com alta toxicidade contra *Artemia salina* L. possuem elevado potencial para citotoxicidade, existindo uma boa correlação entre a toxicidade para este ser vivo e a atividade citotóxica contra tumores humanos. Torna-se, portanto, muito útil a utilização deste bioensaio na orientação de estudos fitoquímicos com vista à descoberta de substâncias bioativas (Amarante et al., 2011; Ogbole et al., 2017; Rajabi et al., 2015).

3.4 Citotoxicidade

Na atualidade o cancro é uma das mais frequentes causas de morte no mundo e a maioria dos tipos de quimioterapia disponível para o tratamento desta doença é pouco eficaz. De facto estes fármacos demonstram-se pouco eficientes devido às resistências que surgem, por

serem pouco específicos e por causarem muitos efeitos adversos atacando indiscriminadamente células saudáveis não patogénicas (Garcia et al., 2018a; Balouiri et al., 2016). Assim, torna-se muito importante encontrar novos compostos bioativos mais eficazes no tratamento destas patologias, terapias com potencial citotóxico e elevada seletividade, consistindo esta atividade numa importantíssima área de investigação (Garcia et al., 2018b).

Este ensaio foi realizado em colaboração 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 e o método utilizado para a análise do crescimento celular foi o método da sulforrodamina B. A sulforrodamina B é um corante aminoxantina de cor rosa, com capacidade de se ligar a componentes proteicos (porções terminais dos aminoácidos) das células fixadas pelo ácido tricloroacético (TCA). Este é um método simples, sensível, reprodutível e rápido (Skehan et al., 1990).

As linhas celulares tumorais humanas usadas neste trabalho foram: carcinoma colorrectal (HCT116), adenocarcinoma humano da mama (MCF-7) e carcinoma do pulmão (H460). A nível mundial, o cancro do pulmão, em ambos os sexos, é o cancro mais comumente diagnosticado e é a principal causa de morte nas mortes por cancro; o cancro da mama, entre mulheres, é o cancro mais comumente diagnosticado e a principal causa de morte por cancro e o cancro colorrectal, em ambos os sexos, está entre os cancros de maior incidência e mortalidade (Bray et al., 2018).

Capítulo I: Parte experimental

1.1 Equipamentos, Reagentes e Materiais

1.1.1 Equipamentos

Aparelho de ultrassons da VWR; Evaporador rotativo (K Ika-WERKE, GMBH \$ CO.KG; D-79219 Staufen Alemanha); Termostato AQUA LYTIC[®]; Espectrófotometro U-1500 Hitachi *Instruments*, Inc USA; Microscópio ótico (OE, CETI Bélgica); Bomba de ar (HI-FLO[®] Single Type 4000) e equipamento de Ressonância Magnética Nuclear (RMN 300 MHz).

1.1.2 Reagentes

Acetona; Acetato de Etilo; Hexano; dimetilsulfóxido (DMSO); Vancomicina; Norfloxacin; Nistatina; 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH); Quercetina e Metanol foram adquiridos pela Sigma. Meio Mueller- Hinton e *Sabouraud dextrose Agar* foram adquiridos pelo Biokar Diagnostics. Sal Artemia JBL e Ovos de Artemia JBL foram adquiridos pela JBL GmbH and Co. KG, D-67141 Neuhofen Alemanha.

1.1.3 Materiais

Placa de sílica gel de cromatografia em camada delgada (ccd) 60F₂₅₄ 20x20 (Merck KGaA) e para a sua revelação utilizou-se uma mistura de metanol e ácido sulfúrico (1:1); Microplacas de 96 poços (Greiner Bio-one GmbH, Alemanha); Papel de filtro Whatman N° 5, Inc., Clifton, NJ, USA; Microplacas de 24 poços e sílica gel 60 PF₂₅₄ adquirida pela Merck, Darmstádio, Alemanha com a referência 7733 nas colunas A e B1 e 9385 nas colunas B2, C1, D1 e C2.

1.1.4 Material das plantas

O material das plantas utilizadas foi fornecido pelo Parque Botânico da Tapada da Ajuda que, por sua vez, são originárias de cortes do Jardim Botânico Nacional Kirstenbosch do sul de África. Foram colhidas entre 2007 e 2008, em junho e setembro, e espécies de referência foram depositadas no Herbário “João de Carvalho e Vasconcellos” do Instituto Superior de Agronomia, Lisboa (LISI), Portugal.

1.1.5 Espécies de micro-organismos

A atividade antimicrobiana de cada extrato foi avaliada contra bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e uma estirpe de SARM, bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 e *Candida albicans* ATCC 10231 obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC).

1.1.6 Linhas celulares tumorais humanas

O Ensaio da citotóxicidade em linhas celulares tumorais humanas foi realizado em colaboração com o LAQV/REQUIMTE, Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, sob a coordenação da Professora Doutora Lucília Saraiva. As linhas de células tumorais humanas utilizadas no ensaio de citotoxicidade foram: carcinoma colorretal (HCT116), adenocarcinoma humano da mama (MCF-7) e carcinoma do pulmão (H460) que foram adquiridas da ATCC.

1.1 Procedimento experimental

1.2.1 Preparação dos extratos e rendimento de extração

Na preparação dos extratos das plantas ocorreram dois momentos de extração. No primeiro momento foi realizada a extração das plantas: *P. mutabilis*, *P. lucidus*, *P. ciliatus*, *P. xerophilus* e *P. crassus*, para avaliação biológica e início do estudo fitoquímico do extrato da *P. mutabilis* (ccd preparativa e correspondente atividade antimicrobiana das frações). No segundo momento foi realizada a extração, até à exaustão, da planta *P. mutabilis* para dar continuidade ao seu estudo fitoquímico (cromatografia em coluna).

Os extratos foram preparados pelo método de ultrassons e na **Tabela 10** estão indicadas as condições da extração.

Tabela 10 - Condições dos dois momentos de extração acetónica por ultrassons.

Condições da extração	Primeiro momento da extração	Segundo momento da extração	
Parte da planta utilizada	Folhas secas trituradas	Folhas secas trituradas	Caules secos triturados
Massa de planta utilizada (g)	3	712,1	489,9
Quantidade de acetona utilizada (mL)	30	8800	15400
Temperatura do banho de ultrassons (°C)	25		
Esquema do processo de extração (sonificação)	3 extrações (3 vezes no banho de ultrassons durante 1 hora cada)	5 extrações (5 vezes no banho de ultrassons durante 1 hora cada)	
Concentração do extrato obtido (% (m/v))	10	8,1	3,2

(Ntungwe et al., 2017).

Posteriormente a cada sonificação, foi feita a filtração do extrato utilizando filtros Whatman papel N° 5 (Whatman, Inc., Clifton, NJ, USA). Os extratos foram depois evaporados utilizando o evaporador rotativo a 40-50 °C. No final foi determinado o rendimento de extração através da **Fórmula 1** (Ntungwe et al., 2017).

Fórmula 1:

$$\text{Rendimento de extração (\% (m/m))} = \frac{\text{massa do extrato obtido (g)}}{\text{massa de planta utilizada (g)}} \times 100$$

1.2.2 Determinação da atividade antioxidante

1.2.2. a) Ensaio qualitativo – Descoloração ccd-DPPH

Realizou-se uma ccd aplicando 10 µL de cada extrato (1 mg/mL em acetona) em espaços separados numa placa de sílica-gel 60F₂₅₄. Após a secagem das aplicações pulverizou-se a placa com uma solução de DPPH (0.002% em metanol) e 10 minutos depois observou-se o resultado (Rijo et al., 2012).

O controlo positivo utilizado foi a quercetina (1mg/mL em acetona), um antioxidante com ação comprovada, e o controlo negativo utilizado foi a acetona (Baghel, Shrivastava, Baghel, & Rajput, 2012; Rijo et al., 2012).

1.2.2. b) Ensaio quantitativo - Método espectrofotométrico de DPPH

Para quantificar a atividade antioxidante dos extratos recorreu-se ao método espectrofotométrico de DPPH. A 990 µL de solução de DPPH (0,002% em metanol) foram adicionados 10 µL de extrato de planta (1 mg/mL em acetona) (Ntungwe et al., 2017).

A mistura foi incubada durante 30 minutos, na escuridão e à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 517 nm, contra o correspondente branco e a atividade antioxidante (%) foi calculada de acordo com a **Fórmula 2** (Ntungwe et al., 2017).

Fórmula 2:

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \left(\frac{\text{Abs. DPPH} - (\text{Abs. amostra})}{\text{Abs. DPPH}} \right) \times 100$$

Nesta fórmula Abs. DPPH corresponde à absorvância do DPPH contra o branco e Abs. amostra corresponde à absorvância do extrato ou controlo contra o branco (Ntungwe et al., 2017).

O controlo positivo utilizado para este ensaio foi a quercetina (1 mg/mL em metanol) e os testes foram realizados em triplicado (Baghel et al., 2012; Ntungwe et al., 2017).

1.2.3 Ensaio da atividade antimicrobiana

1.2.3. a) Método de difusão em poços

Neste ensaio a atividade antimicrobiana de cada extrato foi testada contra espécies de bactérias Gram-positivas: *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 25923, bactérias Gram-negativas: *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853) e leveduras: *S. cerevisiae* ATCC 2601 e *C. albicans* ATCC 10231, obtidas da ATCC (Ntungwe et al., 2017).

Em placas de Petri com 20 mL de meio de cultura Mueller-Hinton sólido, para as bactérias, ou de meio de cultura Agar *Sabouraud Dextrose*, para as leveduras, foram inoculados, em condições assépticas, 0,1 mL de cada suspensão microbiana padronizada, 0,5 na escala de McFarland. A suspensão foi uniformemente espalhada na superfície do meio usando uma zaragatoa estéril (Ntungwe et al., 2017).

Posteriormente, foram feitos poços de aproximadamente 5 mm de diâmetro no meio de cultura, recorrendo a uma pipeta de Pasteur de vidro esterilizada. Nesses poços foram aplicados 50 µL de cada extrato (1 mg/mL em DMSO), os respetivos controlos positivos para cada micro-organismo e o controlo negativo (Ntungwe et al., 2017).

O controlo positivo usado para as bactérias Gram-positivas foi a vacomicina, para as bactérias Gram-negativas foi a norfloxacin, para as leveduras foi a nistatina, preparados a uma concentração de 1mg/mL em DMSO, e o controlo negativo usado foi o DMSO (1mg/mL) (Ntungwe et al., 2017).

As placas foram devidamente identificadas e incubadas durante 24 horas a 37 °C. Por fim, a atividade antimicrobiana foi avaliada através da medição do diâmetro (mm) dos halos de inibição das amostras e dos controlos (Ntungwe et al., 2017).

1.2.3. b) Método de microdiluição - Determinação da CMI, CMB e CMF

A CMI, CMB e CMF foram determinadas apenas para o extrato da espécie *P. mutabilis*, devido aos resultados obtidos no método anterior (método de difusão em poços), recorrendo à técnica de microdiluição proposta pelo CLSI (Balouiri et al., 2016; CLSI, 2003).

As concentrações foram determinadas para as bactérias Gram-positivas: *S. aureus* ATCC 25923 e estirpe de SARM e para a levedura *C. albicans* ATCC 10231 (Ntungwe et al., 2018).

Em cada poço de uma microplaca de 96 poços foram colocados, em condições assépticas, 100 mL de meio *Sabouraud*, para as leveduras, ou de meio Mueller-Hilton, para as bactérias. Posteriormente foram adicionados 100 µL do extrato em estudo (1 mg/mL em DMSO), os respetivos controlos positivos para cada micro-organismo e o controlo negativo (Ntungwe et al., 2018).

O controlo positivo usado para as bactérias Gram-positivas foi a vacomicina, para a levedura foi a anfotericina B, preparados a uma concentração de 1mg/mL em DMSO, e o controlo negativo usado foi o DMSO (1mg/mL) (Ntungwe et al., 2018).

Com uma micropipeta multicanal foi feita uma série de microdiluições de 1:2. Seguidamente 10 µL de cada suspensão microbiana padronizada, 0,5 na escala de McFarland, foram adicionados nos poços. Finalmente as placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 horas (Ntungwe et al., 2018).

A CMI foi determinada quando nenhum crescimento foi detetado no poço da microplaca. Para determinar a CMB e a CMF, um total de 10 µL foi retirado da microplaca e semeado numa placa de petri e quando não ocorreu crescimento microbiano visível nas placas, ficaram determinadas a CMB e a CMF. Os testes foram realizados em triplicado (Santos, Ramos, & Miyagusku, 2017; Ntungwe et al., 2018).

1.2.4 Avaliação da toxicidade geral usando o modelo de *Artemia salina* L.

Com o objetivo de avaliar a toxicidade geral dos diferentes extratos foi realizado o ensaio de letalidade em *Artemia salina* L. Inicialmente a *Artemia salina* L. foi colocada a crescer, de acordo com a literatura Ntungwe et al. (2017, p. 100-101) e Ogbole et al. (2017, p. 2-3).

Aos poços que continham *Artemia Salina* L. foram adicionados 100 µL dos extratos em estudo (10 mg/L em DMSO) e após 24 horas, recorrendo ao microscópio ótico (OE, CETI Bélgica), realizou-se um primeiro registo do número de mortes de náuplios (Ntungwe et al., 2017).

De seguida adicionou-se dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), a uma concentração de 100 mg/mL, e realizou-se um segundo registo do número de mortes. Através da **Fórmula 3** calculou-se, para cada extrato, a % de morte de náuplios de *Artemia salina* L. (Ntungwe et al., 2017).

Fórmula 3:

$$\text{morte de náuplios de } Artemia Salina L. (\%) = \frac{\text{Náuplios totais} - \text{Náuplios vivos}}{\text{Náuplios totais}} \times 100$$

Nesta fórmula o valor do numerador corresponde ao primeiro registo e o valor do denominador corresponde ao segundo registo (Ntungwe et al., 2017).

Os controlos utilizados foram: Solução salina (controlo negativo do meio), DMSO a 10 mg/L (controlo negativo do solvente) e $K_2Cr_2O_7$ a 100 mg/mL (controlo positivo) (Ntungwe et al., 2017).

Os dois extratos mais ativos, com a % de morte de náuplios de *Artemia salina* L. mais elevada, foram novamente testados a uma gama de concentrações entre 0,01 e 1 mg/L. O processo foi repetido como anteriormente e o número de crustáceos mortos foi registado e usado para a realização de gráficos de concentração *versus* % de morte de *Artemia salina* L. Estes gráficos permitiram, através da equação da reta, calcular o valor de CL_{50} . O extrato com o valor de CL_{50} menor foi considerado o extrato mais ativo e, deste modo, foi selecionado para ser testado num ensaio de citotoxicidade (Ntungwe et al., 2017).

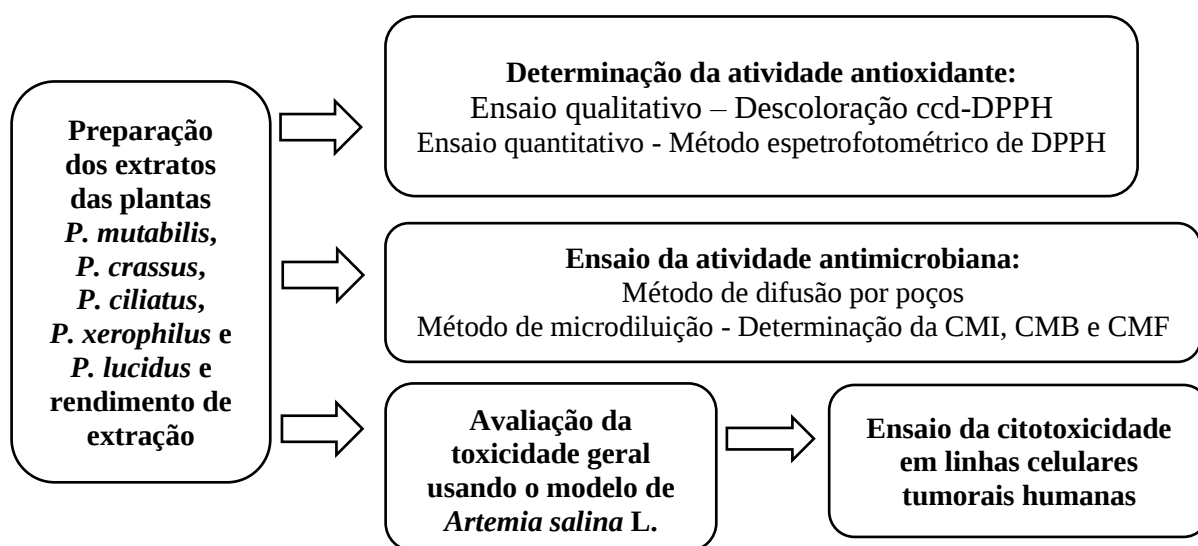
1.2.5 Ensaio de citotoxicidade em linhas celulares tumorais humanas

Este ensaio foi realizado em colaboração 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 com o valor de CL_{50} mais baixo, extrato de *P. mutabilis*, foi testado quanto ao seu potencial antitumoral em diferentes linhas celulares tumorais humanas: carcinoma colorretal (HCT116), adenocarcinoma humano da mama (MCF-7) e carcinoma do pulmão (NCI-H460), adquiridas da ATCC (Ntungwe et al., 2018).

As células foram expostas a várias diluições de extratos acetónicos e os efeitos dos compostos em estudo foram analisados após 48 horas de incubação, recorrendo ao ensaio de sulforrodamina B (SRB) como descrito na literatura Leão et al. (2015, p. 2) e Soares et al. (2015, p. 3). A concentração inibitória de 50% (CI_{50}) (mg/mL) da viabilidade celular foi posteriormente determinada (Ntungwe et al., 2018; Leão et al., 2015; Soares et al., 2015). Os controlos positivos utilizados foram a doxorrubicina e o paclitaxel (Matias et al., 2019).

O procedimento realizado nos cinco extratos, encontra-se organizado no **Esquema 2**.



Esquema 2 – Procedimento realizado nos extratos das espécies *P. mutabilis*, *P. ciliatus*, *P. xerophilus*, *P. lucidus* e *P. Crassus*.

1.2.6 Estudo fitoquímico da espécie *P. mutabilis*

Visto ter sido a *P. mutabilis* a planta que se demonstrou mais bioativa, procedeu-se ao seu fracionamento e isolamento por dois processos: Ccd preparativa e Cromatografia em coluna. Seguidamente procedeu-se à identificação estrutural por ^1H -RMN das frações puras.

1.2.6.1 Fracionamento

1.2.6.1. a) Ccd preparativa e correspondente atividade antimicrobiana

A quantidade de amostra de extrato acetónico de *P. mutabilis* utilizado para este ensaio ccd preparativa ((**Figura 41**), hexano:acetato de etilo (80:20)) foi de apenas 100 mg, pois teve como objetivo identificar as frações biologicamente ativas, após fracionamento, através de um ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em poços.

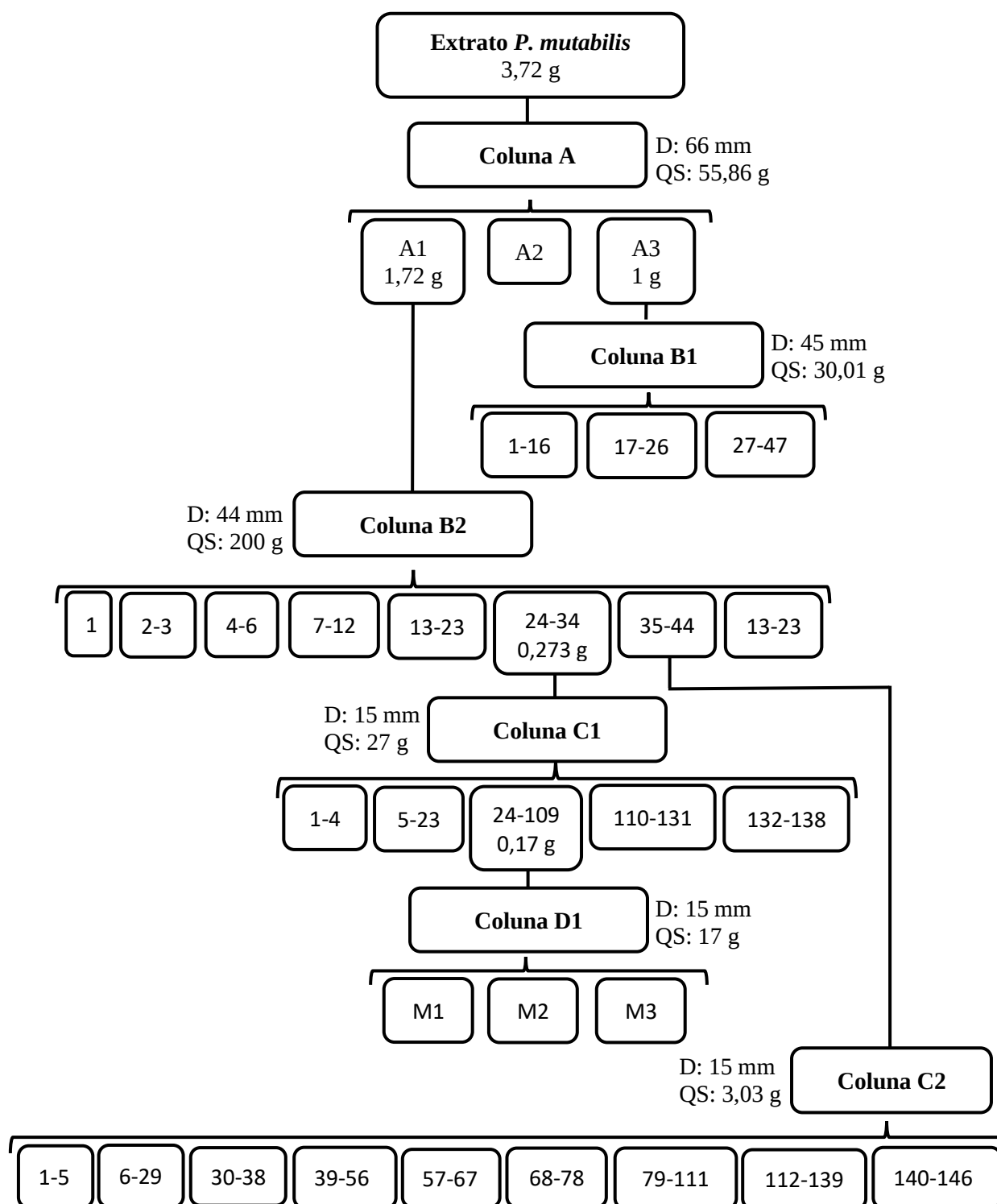


Figura 41 – Alguns passos do método de ccd preparativa **a)** Amostra em eluição na placa de ccd preparativa **b)** Comparação entre a placa de ccd preparativa e a placa de ccd para a separação das frações **c)** Sistema de filtração a vácuo para a desadsorção das frações da sílica (captado a 20/06/2018).

O ensaio da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em poços foi realizado conforme o procedimento da página 79. O extrato total e as frações obtidas foram testadas a uma concentração de 10 mg/mL, os controlos positivos utilizados foram a vancomicina e norfloxacina para as bactérias e nistatina para as leveduras e o controlo negativo utilizado foi o DMSO.

1.2.6.1. b) Cromatografia em coluna

As cromatografias em coluna realizadas e as respectivas frações obtidas encontram-se apresentadas no **Esquema 3**.



Esquema 3 – Esquema das colunas realizadas em que D – diâmetro da coluna e QS – quantidade de sílica utilizada na coluna.

Foram realizados dois tipos de coluna neste trabalho: Cromatografia em coluna *flash* (CC*flash*), nas colunas B2, C1, D1 e C2; e cromatografia em coluna seca sob vácuo (CCSV), nas colunas A e B1.

Em todas as colunas cromatográficas foi-se aumentando a polaridade do eluente e as colunas foram seguidas pela técnica de ccd. Na **Tabela 11** encontram-se registados os eluentes utilizados e as respetivas proporções, em cada coluna.

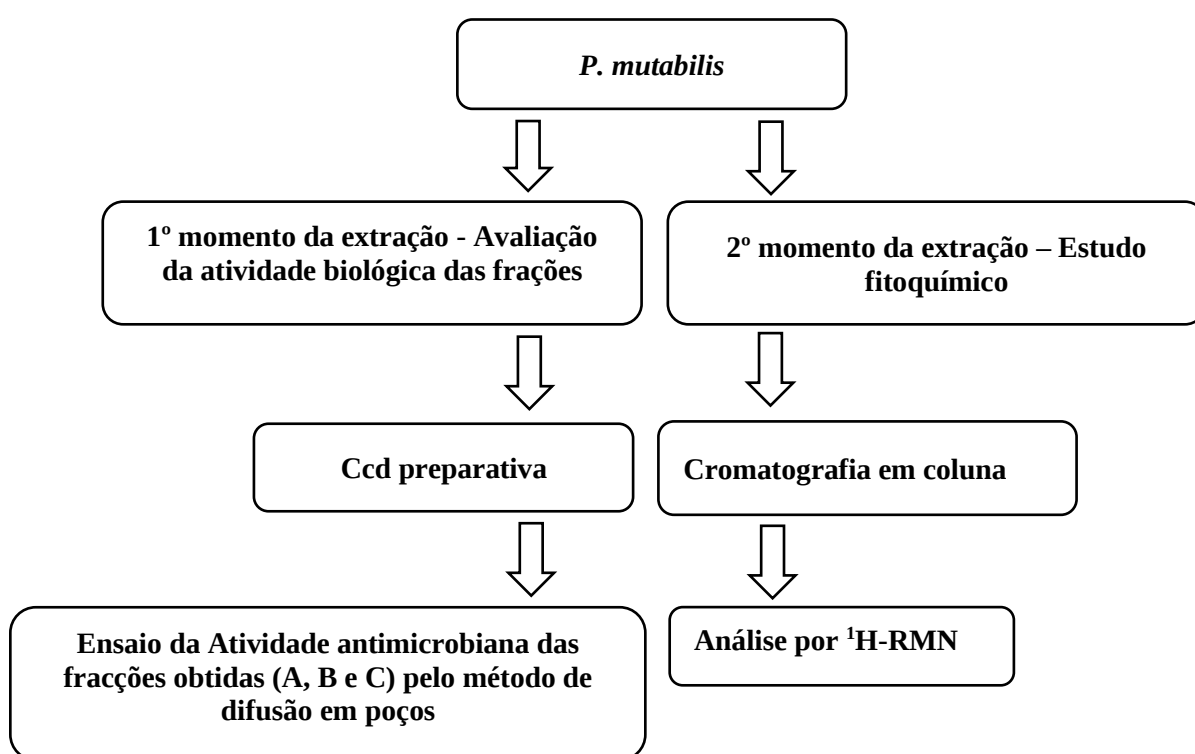
Tabela 11 – Eluentes e respetivas proporções utilizadas nas colunas cromatográficas.

Coluna	Eluente (%) n-hexano:Etanol acetato de etilo	Eluente (%) Etanol acetato de etilo:metanol
A, B1 e B2	100:0	-
	90:10	-
	80:20	-
	70:30	-
	0:100	-
	-	90:10
C1	100:0	-
	95:5	-
	85:15	-
	-	95:5
	-	90:10
D1	100:0	-
	99,5:0,5	-
	99,3:0,7	-
	99:1	-
	98:2	-
	97,5:2,5	-
	97:3	-
	96,5:3,5	-
	96:4	-
	95:5	-
	90:10	-
	50:50	-
	0:100	-
	-	90:10
C2	9,35:0,65	-
	0:100	-
	-	90:10

1.2.6.2 Método de identificação estrutural por ^1H - RMN

As frações consideradas puras por ccd foram analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogénio (^1H -RMN). Os espectros foram registados utilizando um Bruker 300 MHz, CDCl_3 (clorofórmio deuterado). As amostras foram secas numa bomba Buchi, dissolvidas em CDCl_3 e a uma ressonância δ de 7,26 ppm.

O procedimento do estudo fitoquímico da espécie *P. mutabilis* encontra-se apresentado no **Esquema 4**.



Esquema 4 - Esquema do procedimento do estudo fitoquímico da espécie *P. mutabilis*.

Capítulo II: Resultados e Discussão

2.1 Preparação dos extratos e rendimento de extração

O método de extração utilizado foi o método de extração por ultrassons visto ser efetivo na extração de compostos bioativos de plantas. Os ultrassons contribuem para o aumento da permeabilidade da parede celular dos tecidos, facilitando a libertação do que se pretende extrair para o solvente. Esta técnica apresenta várias vantagens: permite uma extração a temperaturas mais baixas, é menos demorada, consome menos energia e solvente, envolve menos passos no processo o que origina um rendimento de extração superior e um produto final mais puro (Azmir et al., 2013; Chemat, Zill-E-Huma, & Khan, 2011; Mason, Chemat, & Vinatoru, 2011; Pandey & Tripathi, 2014).

O solvente selecionado para a extração foi a acetona (solvente orgânico com média polaridade) devido ao facto dos compostos que se pretendiam isolar, como os diterpenos, apresentarem baixa a média polaridade. (Azmir et al., 2013; Rijo et al., 2005; Waksmundzka-Hajnos & Sherma, 2011).

O processo de extração foi realizado em dois momentos. Os extratos obtidos no primeiro momento foram utilizados para a realização dos ensaios de atividade biológica e para a realização de uma ccd preparativa, com posterior ensaio de atividade antimicrobiana das frações, de *P. mutabilis*. O segundo momento envolveu a extração de uma grande quantidade de *P. mutabilis* de modo a dar continuidade ao estudo fitoquímico por cromatografia em coluna.

As placas de ccd realizadas posteriormente à extração, devido às manchas amarelas fluorescentes que continham, demonstraram a potencial presença de abietanos no conteúdo do extrato da planta *P. mutabilis*. Foi inclusive possível observar que o conteúdo das folhas e caules da espécie *P. mutabilis* é equivalente.

Após a extração, através da **Fórmula 1**, foi realizado o cálculo do rendimento de extração (%). Os resultados encontram-se na **Figura 42**.

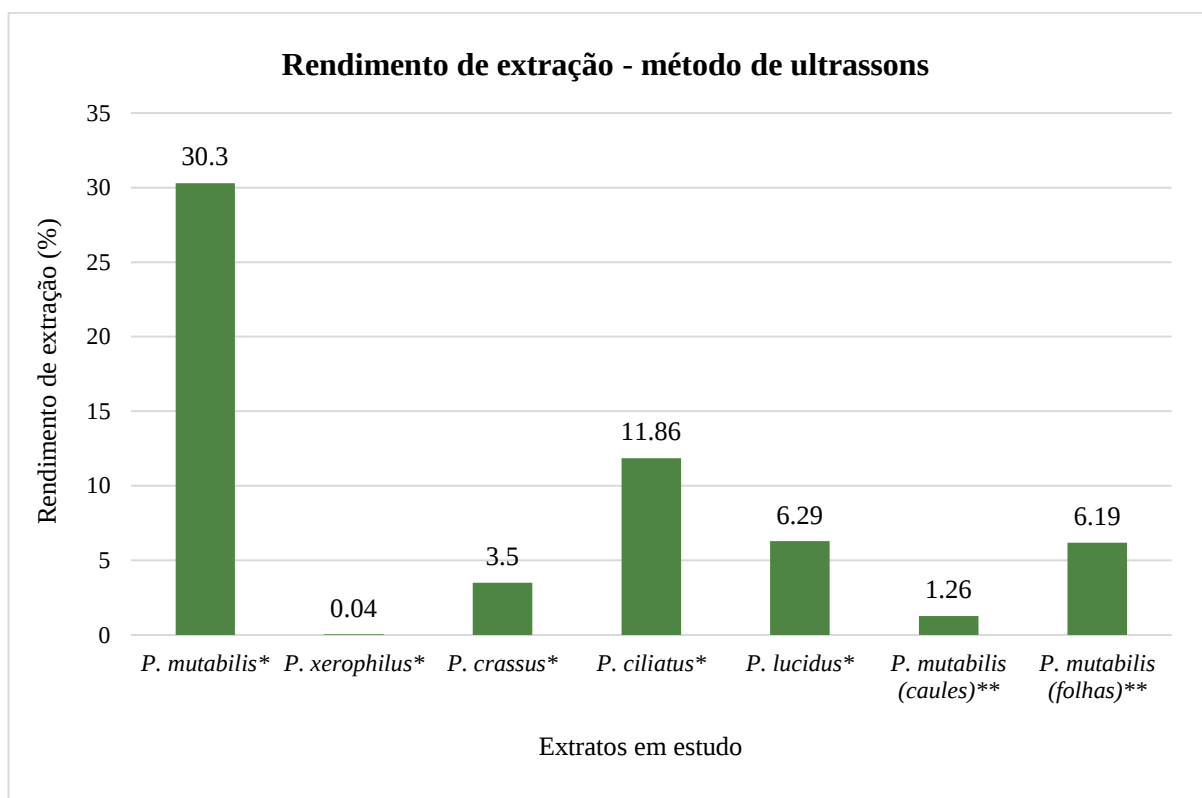


Figura 42 - Rendimento de extração (%), pelo método de ultrassons, das espécies *P. mutabilis*, *P. xerophilus*, *P. crassus*, *P. ciliatus* e *P. lucidus* (* - 1º momento da extração; ** - 2º momento da extração).

Analisando a **Figura 42**, de entre as cinco plantas, a que obteve o maior rendimento de extração foi a *P. mutabilis* no primeiro momento de extração, com o valor de 30,3%.

2.2 Determinação da atividade antioxidante

O aumento dos níveis de enzimas antioxidantes (como a superóxido dismutase e a glutational peroxidase), a atividade quelante em relação a determinados metais e a captura de radicais livres são exemplos de mecanismos que os antioxidantes, derivados de extratos de plantas, podem exercer perante as ERO (Muraina, Suleiman, & Eloff, 2009).

Já terá sido provado que alguns antioxidantes sintéticos apresentam alguma toxicidade para o ADN animal, podendo levar à carcinogénese como por exemplo o butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT) (antioxidantes sintéticos muito usados) (Dawidowicz & Olszowy, 2010; Nsimba, Kikuzaki, & Konishi, 2008). Assim, é grande a procura por antioxidantes naturais mais baratos e eficazes, oriundos das plantas (Nicolai et al., 2016; Rijo et al., 2012; Tomei & Salvador, 2005).

Os terpenóides e os compostos fenólicos são considerados os principais responsáveis pela atividade antioxidante das espécies *Plectranthus* e vários estudos têm vindo a avaliar a propriedade antioxidante destas plantas que se apresentam como uma importante fonte de pesquisa (Ntungwe et al., 2017; Rijo et al., 2012).

2.2.a) Ensaio qualitativo – Descoloração ccd-DPPH

No ensaio de descoloração ccd-DPPH, ensaio qualitativo, todos os extratos demonstraram a presença de uma mancha amarela em fundo roxo, o que significa que possuem atividade antioxidante. Esta informação encontra-se de acordo com a pesquisa bibliográfica realizada sobre as plantas em estudo.

Observou-se também um especial destaque desta mancha para o extrato de *P. mutabilis* o que pode sugerir uma atividade antioxidante mais forte nessa planta. Pois quanto maior for a capacidade da amostra em reduzir o DPPH, ou a capacidade do sequestro do radical livre, mais amarelada é a mistura do extrato com o DPPH e maior é o potencial antioxidante desse extrato (Pires et al., 2017; Nicolai et al., 2016; Pisoschi et al., 2009).

2.2.b) Ensaio quantitativo - Método espectrofotométrico de DPPH

Visto que todos os extratos apresentaram atividade antioxidante no ensaio qualitativo, procedeu-se à sua determinação quantitativa, utilizando a quercetina como controlo positivo. Os resultados da determinação quantitativa da atividade antioxidante (%) encontra-se na **Figura 43**.

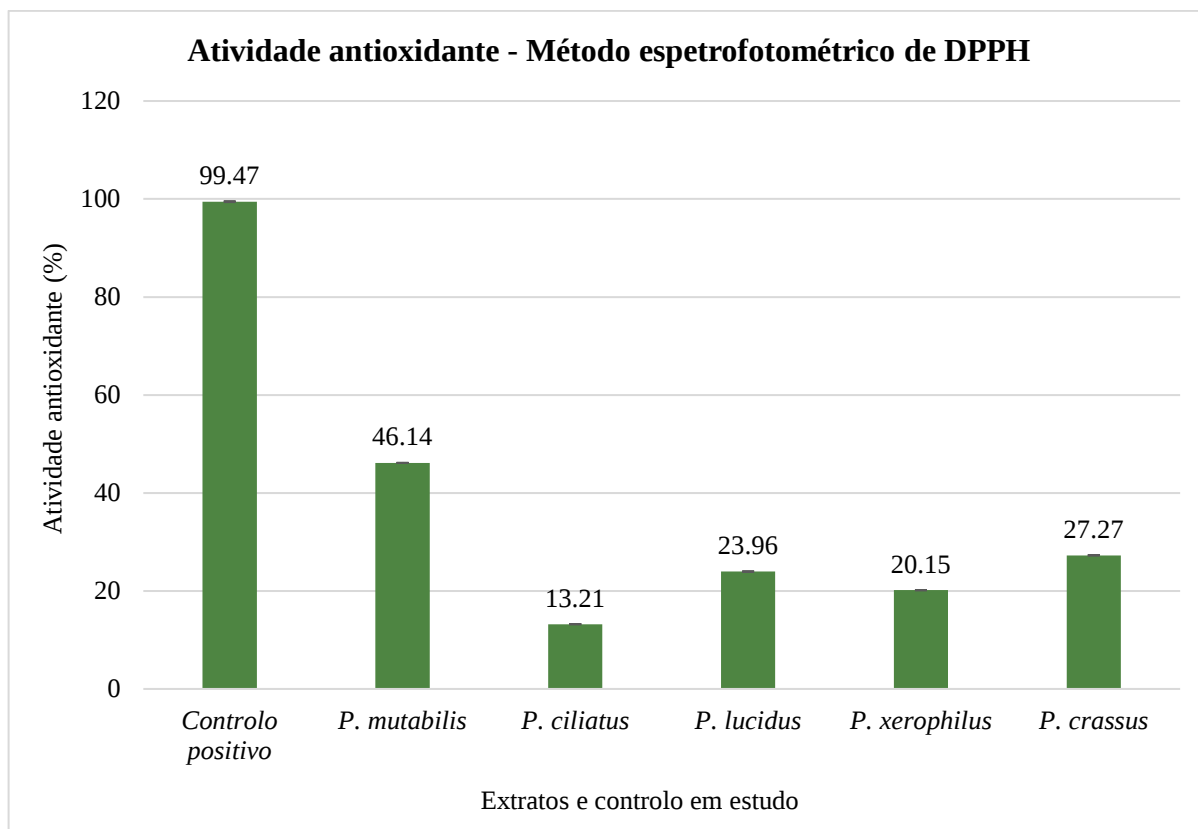


Figura 43 - Atividade antioxidante (%), pelo método espectrofotométrico de DPPH, dos extratos das espécies *P. mutabilis*, *P. ciliatus*, *P. xerophilus*, *P. crassus* e *P. lucidus* e controlo positivo (quercetina), a uma concentração de 1 mg/mL, com os respetivos desvios padrão.

De acordo com a **Figura 43**, quando comparados os resultados dos extratos com o do controlo positivo (99,47%) é possível concluir que todos apresentaram moderada capacidade no sequestro do radical livre. O extrato da planta *P. mutabilis* foi o que apresentou a maior % de atividade antioxidante com o valor de 46,14%.

2.3 Ensaio da atividade antimicrobiana

As infecções comunitárias e hospitalares causadas por bactérias resistentes aos antibióticos, um problema de saúde pública, são uma das principais causas de morte em todo o mundo. As estirpes de SARM (um micro-organismo comensal, comumente citado como sendo um importante patógeno hospitalar adquirido), as estirpes de *S. aureus* resistentes à vancomicina (SARV) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (ERV) são exemplos de resistências cada vez mais comuns (Balouiri et al., 2016; Neto et al., 2015; Rijo et al., 2013a).

O mau uso de antibióticos que outrora terão salvo vidas, nas últimas décadas, tem contribuído para a resistência intrínseca dos microorganismos e as infecções comuns e hospitalares cada vez mais exigem uma terapêutica com antibióticos de 2ª e 3ª linhas. (Pereira et al., 2015; Rijo et al., 2012). Também as infecções hospitalares fúngicas são de grande relevância pelas resistências que têm vindo a desenvolver, como é exemplo a *Candida albicans*, em parte, devido ao mau uso dos antifúngicos (Moreira et al., 2017).

Os polimorfismos genéticos e a super-expressão de bombas de efluxo são exemplos de mecanismos de resistência que surgem aos antibióticos e antifúngicos convencionais. A inovação nesta área cada vez é menor e o desenvolvimento de medicamentos deste grupo não proporciona um retorno financeiro que compense o investimento que exige, contribuindo assim para a atual crise no combate aos micro-organismos resistentes (Rijo et al., 2013a).

De modo a ser possível fazer-se a gestão destas resistências, torna-se essencial a procura de novos compostos bioativos antibacterianos e antifúngicos, com novos modos de ação, nomeadamente de origem natural. Estes compostos são há muito tempo usados para tratar infecções e geralmente apresentam estruturas químicas complexas que dificultam o reconhecimento das macromoléculas pelas bactérias e fungos patogénicos, limitando assim as interações específicas entre eles (Neto et al., 2015; Ntungwe et al., 2017; Pereira et al., 2015).

A atividade antimicrobiana tem sido muito atribuída ao género *Plectranthus* que tem demonstrado frequentemente atividade contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras. Os terpenóides são considerados os principais compostos responsáveis pela propriedade antimicrobiana destas plantas, como os abietanos com estrutura roleanona que já demonstraram propriedade antimicrobiana potente (Pereira et al., 2015; Rijo et al., 2012).

2.3.a) Método de difusão em poços

Os resultados do método de difusão em poços encontram-se na **Figura 44**.

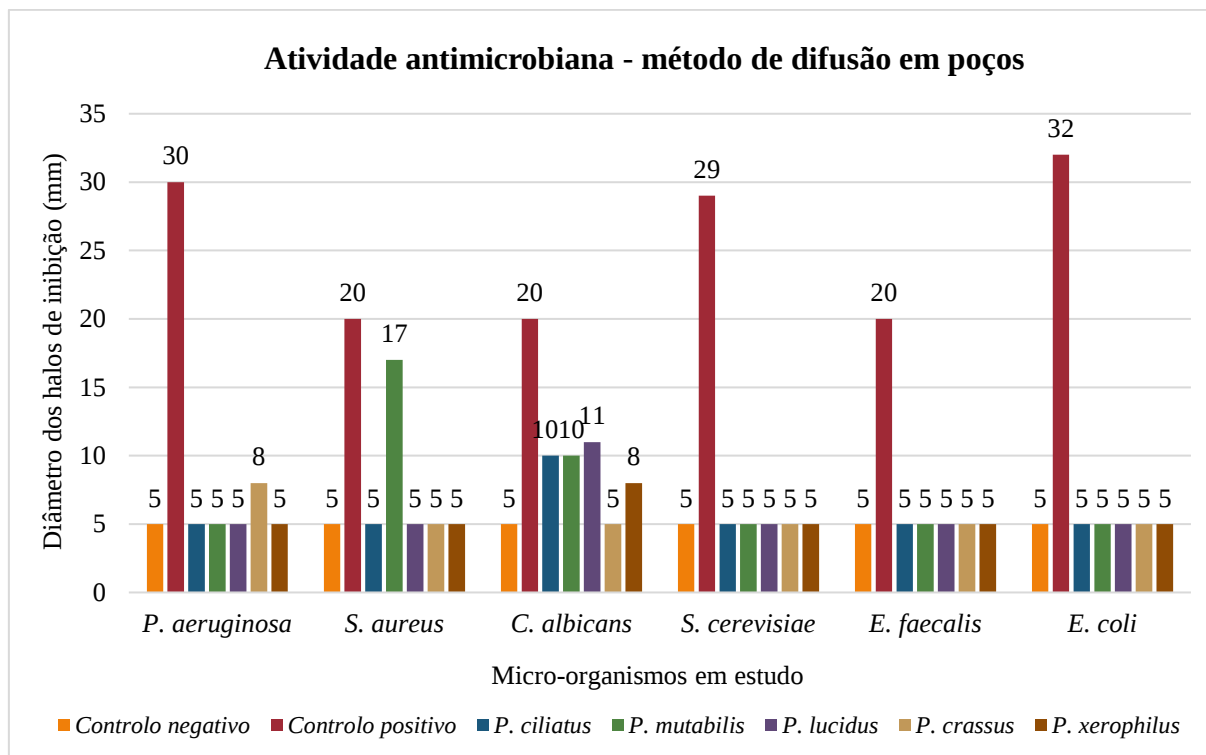


Figura 44 - Atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em poços, dos extratos das espécies *P. ciliatus*, *P. mutabilis*, *P. lucidus*, *P. crassus* e *P. xerophilus*; do controlo negativo DMSO e dos controlos positivos: vancomicina e norfloxacina para as bactérias (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*) e nistatina para as leveduras (*C. albicans* e *S. cerevisiae*) a uma concentração de 1 mg/mL.

Observando a **Figura 44** é perceptível que nenhum dos extratos demonstrou atividade antimicrobiana significativa contra a bactéria Gram-positiva *E. faecalis*, as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli* e a levedura *S. cerevisiae*, apresentando zonas de inibição equivalentes às do controlo negativo, DMSO (5 mm) ou próximas deste (8 mm). O resultado obtido nas bactérias Gram-negativas pode dever-se à membrana externa presente nessas bactérias que dificulta a passagem das moléculas e assim impede a ação dos extratos (Rijo et al., 2013b).

Tendo em conta a pesquisa bibliográfica realizada, seria esperado que o extrato de *P. ciliatus* demonstrasse atividade contra *S. aureus* (Rabe & Van Staden, 1998); que o extrato de *P. lucidus* apresentasse atividade contra *E. faecalis* e *S. aureus* (Simões et al., 2010a; Gaspar-Marques et al., 2008) e que os extratos de *P. crassus* e de *P. xerophilus* demonstrassem atividade contra *C. albicans* (Grayer et al., 2003). Estes resultados não se comprovaram sendo

que os valores dos halos de inibição dos extratos são iguais ao valor do controlo negativo DMSO (5 mm) ou próximos deste (8 mm).

O extrato de *P. lucidus* e de *P. ciliatus* demonstraram uma atividade antimicrobiana moderada contra *C. albicans* (valores dos halos de inibição de 11 e 10 mm, respetivamente, em relação a um controlo positivo de 20 mm) o que se encontra em conformidade com a pesquisa bibliográfica realizada (Grayer et al., 2003; Becerra et al., 2002).

O extrato mais bioativo foi o de *P. mutabilis* visto que demonstrou uma atividade antimicrobiana significativa contra *S. aureus* (com um valor de halo de inibição de 17 mm, muito próximo do valor de 20 mm do controlo positivo) e moderada contra *C. albicans* (com um halo de inibição de 10 mm em relação a um controlo positivo de 20 mm). Por isso procedeu-se à determinação da CMI, CMB e CMF para este extrato.

2.3.b) Método de microdiluição - Determinação da CMI, CMB e CMF

A CMI, CMB e CMF permitem compreender qual o tipo de inibição que determinada amostra causa em determinada espécie microbiana. A inibição pode ser bacteriostática (mesmo que o crescimento microbiano não seja visível, não quer dizer que não existam células viáveis que após a remoção do composto em estudo voltam a proliferar) ou bactericida (morte do micro-organismo causada pelo composto em estudo) (Wiegand et al., 2008).

É possível ter uma noção relativamente ao nível da atividade antimicrobiana de determinado extrato, de acordo com os intervalos de CMI ($\mu\text{g/mL}$) na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Atividade antimicrobiana, de amostras de especiarias e vegetais, de acordo com os intervalos do valor de CMI ($\mu\text{g/mL}$).

Intervalos do valor de CMI ($\mu\text{g/mL}$)	Atividade antimicrobiana
Inferior a 1	Alta
1 a 10	Significativa
10 a 100	Moderada
100 a 1000	Baixa
Acima de 1000	Inexistente

(Wansi., Devkota, Tshikalange, & Kuete, 2013).

Uma vez que o extrato de *P. mutabilis* demonstrou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *C. albicans*, determinou-se a sua CMI, CMB e CMF tornando possível compreender qual o tipo de inibição que exerce sobre esses micro-organismos. Os resultados do ensaio encontram-se na **Figura 45**.

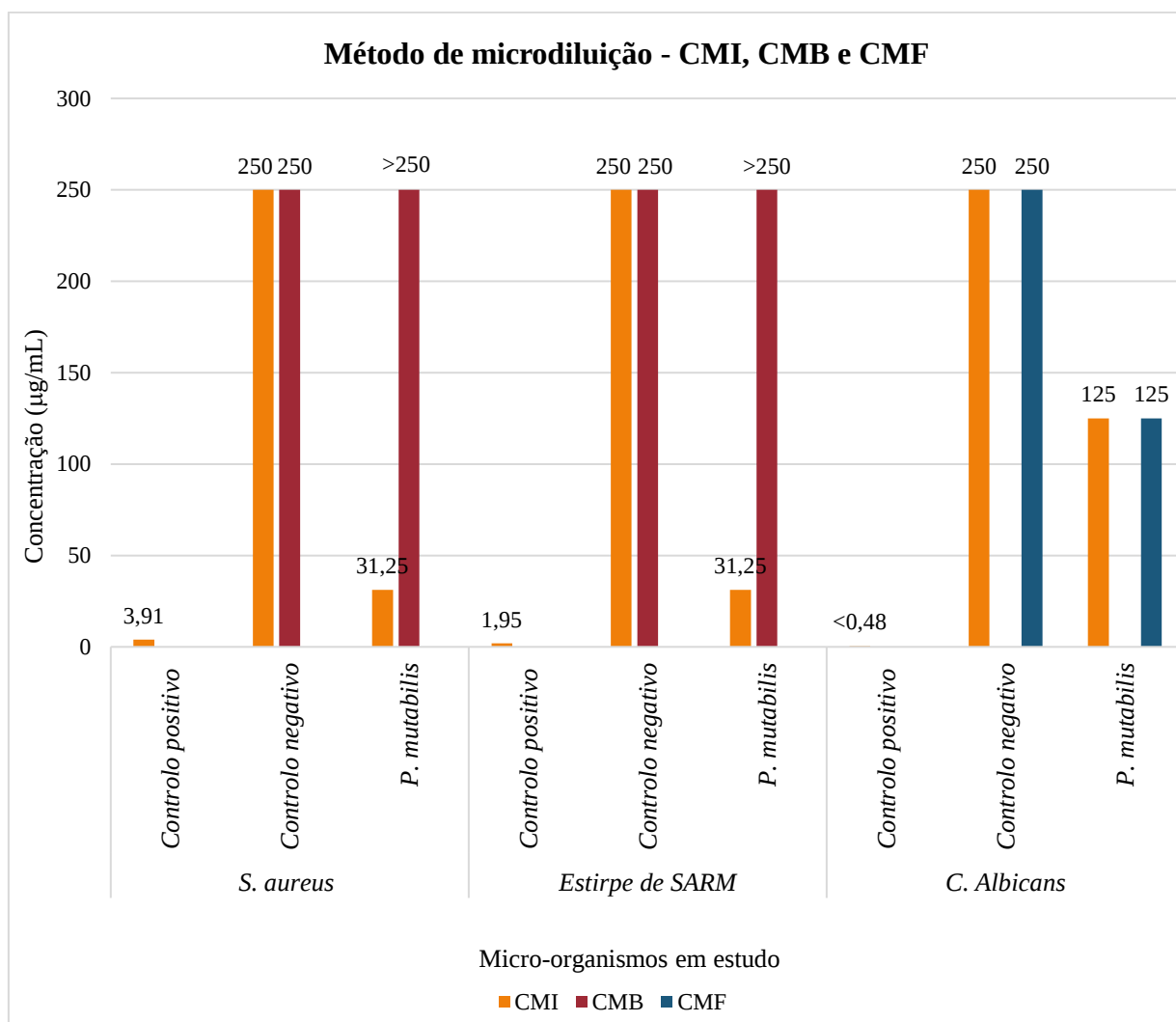


Figura 45 - CMI, CMB e CMF (µg/mL) do extrato da espécie *P. mutabilis*, dos controles positivos (vancomicina para *S. aureus* e estirpe de SARM e anfotericina B para *C. albicans*) e controle negativo (DMSO), pelo método de microdiluição.

Tendo em conta a **Figura 45** e a **Tabela 12**, o extrato de *P. mutabilis* apresenta contra a estirpe de SARM e *S. aureus* um valor de CMI entre 10 e 100 µg/mL (31,25 µg/mL) o que revela uma atividade inibidora moderada. Contra *C. albicans* apresenta um valor de CMI entre 100 e 1000 µg/mL (125 µg/mL) o que revela uma atividade inibidora baixa. Uma vez que o extrato de *P. mutabilis* inibe o crescimento de *S. aureus* e da estirpe de SARM sem lhes causar morte, pois o valor da CMB é muito superior ao valor da CMI, exerce uma atividade bacteriostática sobre estes micro-organismos. Em relação à *C. albicans*, o extrato de *P. mutabilis* apresenta atividade bactericida pois o valor da CMI é idêntico ao da CMB (125 µg/mL) o que indica que não ocorreu crescimento microbiano na placa de petri (Wansi et al., 2013).

2.4 Avaliação da toxicidade geral usando o modelo de *Artemia salina* L.

Os produtos naturais, como já foi referido, para além das propriedades farmacológicas podem possuir propriedades tóxicas. A avaliação da toxicidade geral usando o modelo da *Artemia Salina* L. tem-se revelado muito eficiente no estudo da toxicidade geral de extratos vegetais (Amarante et al., 2011; Hamidi et al., 2014). É uma excelente ferramenta para previsão da potencial toxicidade de extratos de plantas em humanos e é um ensaio preliminar ao ensaio de citotoxicidade, sendo que após a realização deste é possível selecionar os extratos a testar em células tumorais (Amarante et al., 2011; Ogbole et al., 2017).

Os resultados do ensaio são apresentados na **Figura 46**.

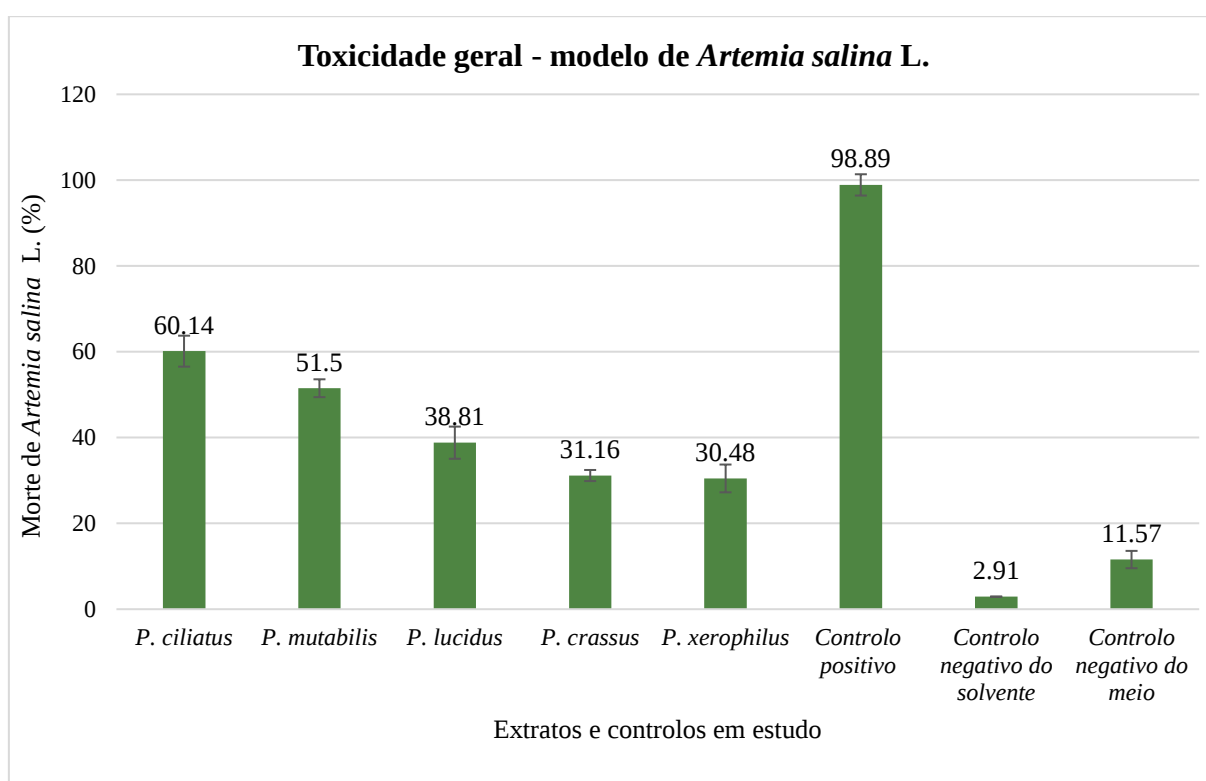


Figura 46 - Toxicidade geral, usando o modelo de *Artemia Salina* L., dos extratos das espécies *P. mutabilis*, *P. ciliatus*, *P. xerophilus*, *P. crassus* e *P. lucidus* (0,01 mg/mL) e dos controlos: negativo do solvente (DMSO a 0,01 mg/mL), negativo do meio (Sal) e positivo ($K_2Cr_2O_7$ a 100 mg/mL) com os respetivos desvios padrão.

Por observação da **Figura 46** os dois extratos que demonstraram a maior toxicidade geral foram os das espécies *P. ciliatus* e *P. mutabilis* com, respetivamente, 60,14% e 51,50% de morte de *Artemia salina* L. O extrato de *P. ciliatus* apresentou um resultado expectável, pois já foi caracterizado como citotóxico (Le Roux, Prinsloo, & Meyer, 2015; Saeed et al., 2016).

Para estes extratos, com a maior toxicidade geral, calculou-se o valor de CL_{50} recorrendo às equações das retas, dos gráficos de % de morte de *Artemia salina* L. versus concentração de extrato (mg/L) que se encontram representados nas **Figuras 47 e 48**.

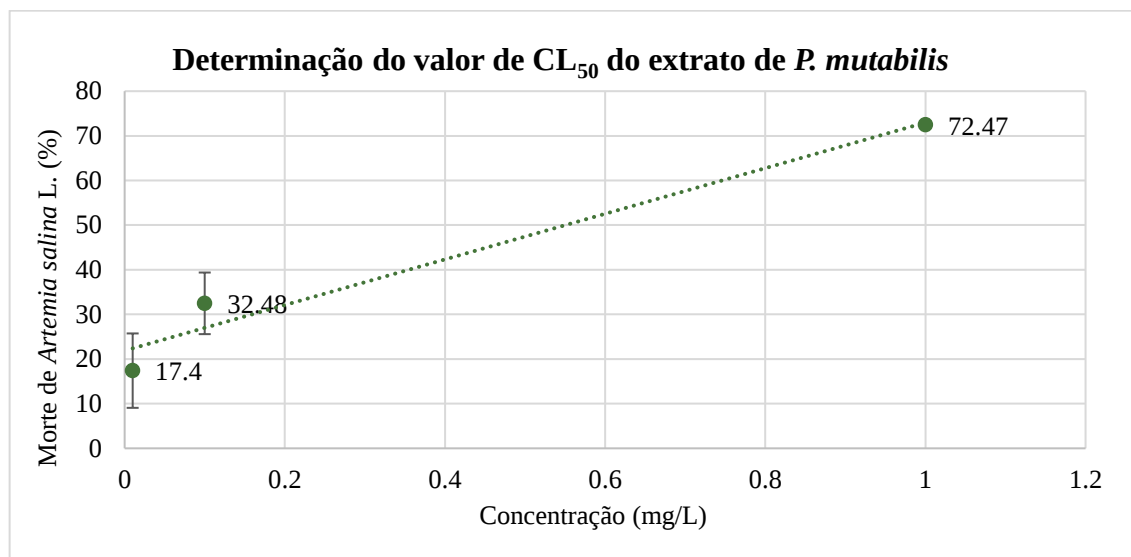


Figura 47 - Gráfico da morte de *Artemia salina* L. (%) em função da concentração do extrato da espécie *P. mutabilis* (0,01; 0,1 e 1 mg/L), com os respetivos desvios padrão, para a determinação do valor de CL_{50} .

A equação da reta da **Figura 47** para o cálculo do CL_{50} , do extrato de *P. mutabilis*, resultou em: $y=51,089x+21,881$ com $R^2= 0,9659$.

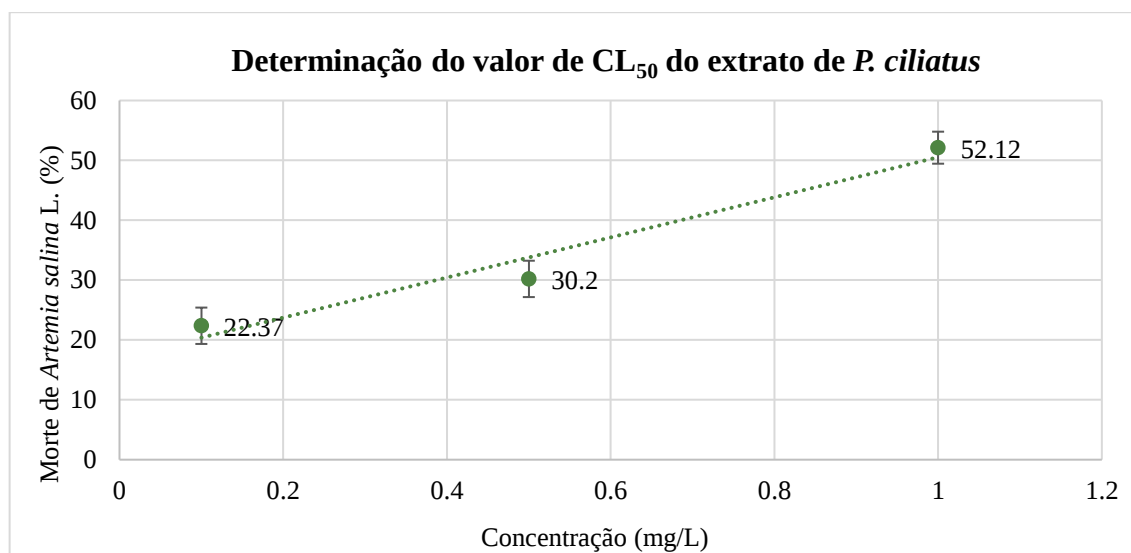


Figura 48 - Gráfico da morte de *Artemia salina* L. (%) em função da concentração do extrato da espécie *P. ciliatus* (0,1; 0,5 e 1 mg/L), com os respetivos desvios padrão, para a determinação do valor de CL_{50} .

A equação da reta da **Figura 48**, para o cálculo do CL₅₀, do extrato de *P. ciliatus* resultou em: $y=33,498+17,031$ com $R^2= 0,9594$.

Os valores de CL₅₀, calculados através das equações das retas apresentadas, são para *P. mutabilis* e *P. ciliatus*, 0,55 e 0,984 mg/L, respetivamente.

Uma vez que o menor valor corresponde à maior toxicidade geral conclui-se que a *P. mutabilis* é a espécie mais tóxica.

2.5 Ensaio da citotoxicidade em linhas celulares tumorais humanas

Cada vez mais se torna imperativo encontrar formas de tratar ou prevenir o cancro, patologia que progressivamente ameaça a vida dos seres humanos e animais (Garcia et al., 2018b).

Tem-se, cada vez mais, recorrido aos compostos naturais e seus derivados pelo facto de serem menos tóxicos comparados com os tratamentos como a quimioterapia (Greenwell & Rahman, 2015; Cragg & Newman, 2013) e os abietanos, por exemplo, presentes nas *Plectranthus*, já terão demonstrado atividade citotóxica relevante (Burmistrova et al., 2015).

Este ensaio foi realizado no extrato mais ativo (*P. mutabilis*) do ensaio anterior (avaliação da toxicidade geral usando o modelo de *Artemia salina* L.). Os resultados encontram-se na **Tabela 13** e os valores de CI_{50} obtidos foram comparados com controlos positivos.

Tabela 13 - Valores da CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) do extrato da espécie *P. mutabilis* e dos controlos positivos (doxorrubicina e paclitaxel) contra linhas celulares tumorais humanas (HCT116, MCF-7 e NCI-H460).

Extratos em estudo		Linhas celulares tumorais humanas utilizadas		
		HCT116	MCF-7	NCI-H460
<i>P. mutabilis</i>		28.00±2.00	35.00±1.00	36.00±2.00
Controlo positivo*	Doxorrubicina	0.125±0.0013	0.16±0.0018	-
	Paclitaxel	-	-	0.117±0.013

*(Matias et al., 2019)

O extrato de *P. mutabilis* em comparação com os controlos positivos utilizados apresenta valores de citotoxicidade moderada.

2.6 Estudo fitoquímico da espécie *P. mutabilis*

Após constatar que o extrato da *P. mutabilis* demonstrou ser o mais bioativo de entre os extratos das cinco plantas em estudo, procedeu-se ao seu fracionamento de forma a detetar quais as frações de interesse. Foi realizado um primeiro método de fracionamento (ccd preparativa), seguido de um ensaio de bioatividade (atividade antimicrobiana), de forma a localizar as frações bioativas. De seguida, realizou-se um fracionamento em maior escala (cromatografia em coluna) para posterior identificação dos compostos responsáveis pela bioatividade demonstrada.

2.6.1 Fracionamento

2.6.1.a) Ccd preparativa e correspondente atividade antimicrobiana

Com a quantidade de extrato de *P. mutabilis* obtido no primeiro momento de extração foi realizado o primeiro fracionamento, através do método de ccd preparativa.

Deste fracionamento surgiram três frações A, B e C (polaridade sucessivamente crescente) (**Figura 49**).

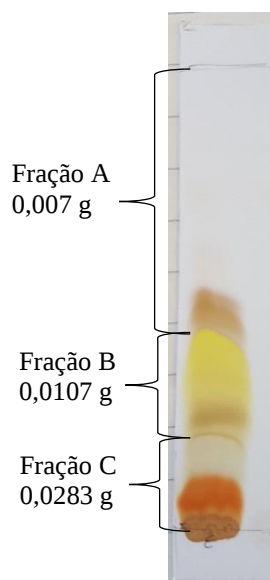


Figura 49 - Placa de ccd das frações A, B e C (polaridade sucessivamente crescente), do extrato da espécie *P. mutabilis*, e respetivas massas (g) (captado a 20/06/2018).

As 3 frações obtidas foram posteriormente testadas quanto à sua atividade antimicrobiana, de forma a identificar qual delas seria a de maior bioatividade. Os resultados encontram-se na **Figura 50**.

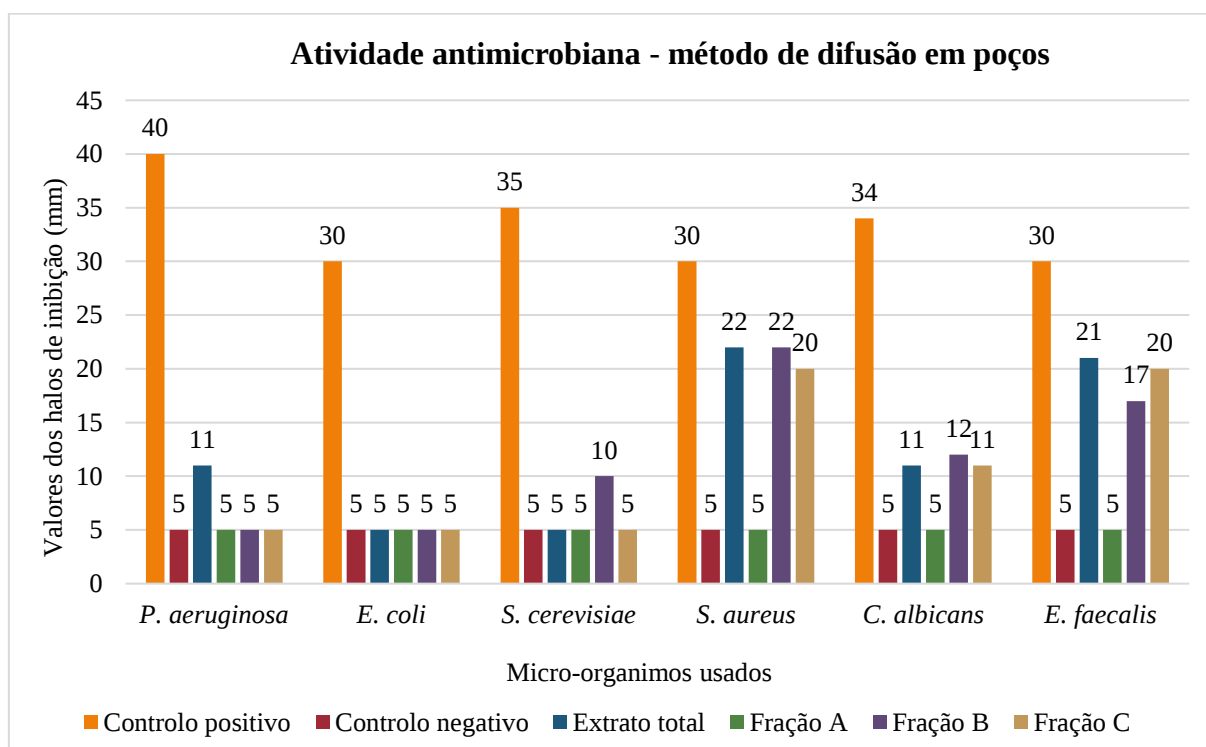


Figura 50 - Atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em poços, do extrato total e das frações A, B e C da espécie *P. mutabilis*, do controlo negativo DMSO e dos controlos positivos: norfloxacina e vancomicina para as bactérias (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis* e *E. coli*) e nistatina para as leveduras (*C. albicans* e *S. cerevisiae*), a uma concentração de 10 mg/mL.

Observando os resultados da **Figura 50** é perceptível que o extrato de *P. mutabilis* não é ativo contra *E. coli* (valores dos halos de inibição equivalentes ao do controlo negativo, 5 mm).

A fração B contra *S. cerevisiae* (10 mm) e o extrato total contra *P. aeruginosa* (11 mm), tendo em conta os valores dos halos de inibição dos seus controlos, demonstraram atividade antimicrobiana baixa.

As frações B, C e o extrato total de *P. mutabilis* demonstraram atividade antimicrobiana moderada contra *C. albicans* (12, 11 e 11 mm, respetivamente) e significativa contra *S. aureus* (22, 20 e 22 mm, respetivamente) e *E. faecalis* (17, 20 e 21 mm, respetivamente).

Conclui-se assim que são as frações B e C, presentes no extrato, as responsáveis pela sua atividade antimicrobiana e, portanto, as mais bioativas e a fração A a mais inativa. A fração

B e C são as mais polares e correspondem às manchas amarelas fluorescentes, possíveis abietanos, observadas anteriormente (página 88).

2.6.1.b) Cromatografia em coluna

Após a identificação das possíveis frações bioativas, procedeu-se a um fracionamento em maior escala através de uma cromatografia em coluna.

No fracionamento total deste estudo (**Esquema 3**) realizaram-se duas colunas CCSV e quatro colunas CCflash. As frações foram associadas entre si de acordo com a similaridade das manchas de ccd. As frações obtidas e as respetivas massas (g), encontram-se registadas na **Tabela 14**.

Tabela 14 - Frações obtidas nas colunas cromatográficas e respetivas massas (g).

Coluna	Quantidade colocada na coluna (g)	Frações óbtidas	Massa das frações (g)	Soma das massas das frações (g)
A	3,7175	A1 (1-23)	1,7172	3,0799
		A2 (24-36)	0,3627	
		A3 (37-48)	1	
B1	1	1-16	0,0143	0,0721
		17-26	0,0213	
		27-47	0,0365	
B2	1,7172	1	0,0627	0,9377
		2-3	0,0159	
		4-6	0,0204	
		7-23	0,1729	
		24-34	0,2726	
		35-44	0,13	
		45-152	0,2632	
C1	0,2726	1-4	0,0169	0,2724
		5-23	0,0497	
		24-109	0,1165	
		110-138	0,0893	
D1	0,1694	1-37 (M1)	0,0191	0,2422
		38-48,57 e 58	0,0078	
		49-56 (M2)	0,0057	
		59-82	0,0214	
		83-123	0,0142	
		124-133 (M3)	0,0114	
		134-163 e 166	0,0106	
C2	0,13	164, 165 e 167-187	0,152	0,1255
		1-5	0,0132	
		6-29	0,013	
		30-38	0,0109	
		39-56 (M4)	0,0129	
		57-67	0,0155	
		68-78	0,0300	
		79-111	0,0109	
		112-139	0,0172	
		140-146	0,0019	

Através da coluna C2, a última coluna realizada, obteve-se a fração M4 (constituída pelas frações 39 a 56) que após a observação das placas de ccd, por se apresentar mais pura, foi analisada por ^1H -RMN.

2.6.2 Método de identificação estrutural por ^1H - RMN

O resultado obtido do ^1H -RMN realizado à fração M4 encontra-se na **Figura 51**.

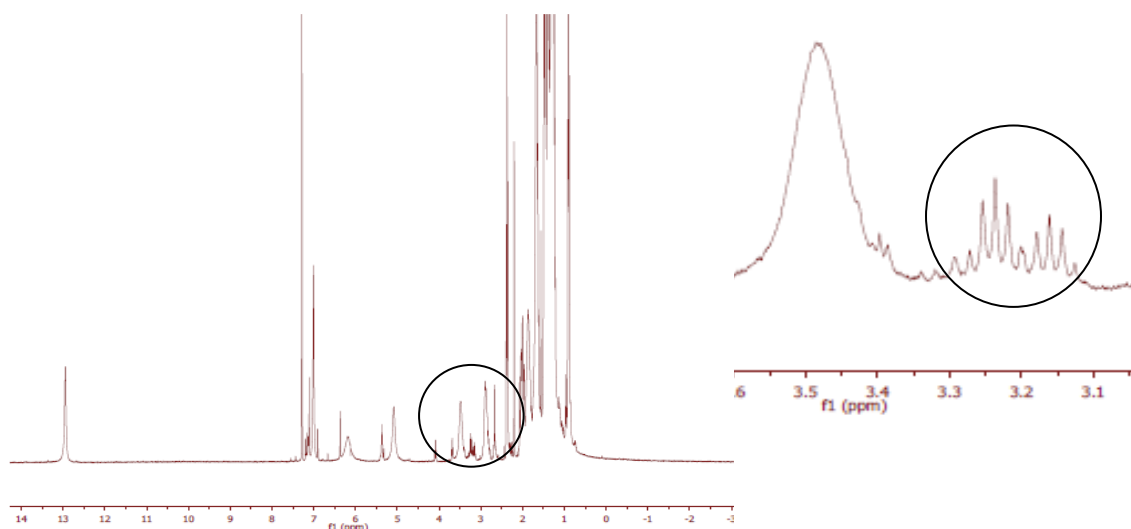


Figura 51 - Espectro de ^1H -RMN da fração M4 (esquerda) com zoom na região dos 3,24 ppm (direita).

O espectro de ^1H -RMN obtido da fração M4, **Figura 51**, apresentou a presença de uma mistura de abietanos. Esta interpretação resultou da observação do sinal correspondente ao próton H-15 (septeto) característico do esqueleto de abietano.

Este resultado aliado à observação dos compostos com fluorescência, mencionados anteriormente na página 88, confirmam a presença de diterpenos com esqueleto de abietano no conteúdo da fração M4, do extrato da planta *P. mutabilis*. Esta fração tem uma polaridade semelhante à da fração B que corresponde à fração bioativa do mesmo extrato.

Seria interessante prosseguir com a purificação do extrato de *P. mutabilis* de forma a poder identificar quais os abietanos bioativos presentes.

Todos os ensaios realizados permitem tirar conclusões quanto a várias características dos extratos, contribuindo para a evolução na investigação científica de plantas do género *Plectranthus*.

Após a realização de todos os ensaios foi-nos possível estudar e/ou comprovar várias atividades que alguns extratos do género *Plectranthus* possuem e que poderão, futuramente, vir a ser mais investigadas de modo a contribuírem para a saúde Humana.

Conclusão

As plantas do género *Plectranthus* são muito utilizadas na medicina tradicional e têm demonstrado diversas bioatividades relevantes. Neste trabalho pretendeu-se validar a atividade biológica de cinco espécies do género *Plectranthus* (*P. mutabilis*, *P. lucidus*, *P. xerophilus*, *P. crassus* e *P. ciliatus*) recorrendo-se a ensaios de atividade antioxidante, antimicrobiana, toxicidade geral e citotoxicidade.

A espécie *P. mutabilis*, no primeiro momento de extração, obteve o rendimento de extracção mais elevado (30,3%) entre as cinco plantas em estudo (0,04%-30,3%).

No ensaio da atividade antioxidante o extrato de *P. mutabilis* demonstrou ser o mais ativo quer pelo método qualitativo, no qual apresentou a mancha amarela de maior destaque, quer pelo método quantitativo (46,14%), no qual demonstrou o valor mais elevado comparativamente com as restantes plantas (13,21%-46,14%).

Quanto ao ensaio da atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em poços, o extrato da espécie *P. mutabilis* foi o mais bioativo demonstrando atividade antimicrobiana significativa contra *S. aureus* (diâmetro do halo de inibição de 17 mm) e atividade antimicrobiana moderada contra *C. albicans* (diâmetro do halo de inibição de 10 mm). Após selecção dos mico-organismos sensíveis ao extrato de *P. mutabilis*, foram determinados os valores de CMI (31,25 µg/mL para a estirpe de SARM e para *S. aureus* e 125 µg/mL para *C. albicans*), CMB e CMF (125 µg/mL), resultando numa atividade inibidora moderada e bacteriostática contra a estirpe de SARM e *S. aureus* e atividade inibidora baixa e bactericida contra *C. albicans*.

No ensaio da toxicidade geral em *Artemia salina* L., os extratos de *P. ciliatus* e de *P. mutabilis* apresentaram valores de 60,14% e 51,5% respetivamente, os dois valores mais elevados (30,48%-60,14%), e foi determinado o valor de CL₅₀. O extrato de *P. mutabilis* apresentou um valor potente de CL₅₀, 0,55 mg/L, e, portanto, foi posteriormente testada a sua citotoxicidade. A citotoxicidade do extrato de *P. mutabilis* foi moderada nas três linhas celulares humanas testadas (HCT116 = 28.00±2.00; MCF-7 = 35.00±1.00 e NCI-H460 = 36.00±2.00 µg/mL).

Comparando as cinco plantas em estudo o extrato de *P. mutabilis* foi o que revelou ser mais bioativo, portanto foram realizados ensaios fitoquímicos por ccd preparativa e por coluna cromatográfica.

O primeiro ensaio por ccd preparativa, em pequena escala (100 mg), foi seguido de um ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em poços. Deste ensaio obtiveram-se três frações (A, B e C) e as frações mais polares B e C foram as que demonstraram

maior atividade antimicrobiana, contra *S. aureus* (22 e 20 mm, respetivamente), *C. albicans* (12 e 11 mm, respetivamente) e *E. faecalis* (17 e 20 mm, respetivamente).

No segundo ensaio em maior escala (3,72 g) foram realizadas várias cromatografias em coluna de modo a isolar as frações bioativas. A fração mais pura neste estudo, fração M4, foi estudada por ^1H -RMN e revelou a presença de uma mistura de compostos de esqueleto de abietano. Esta identificação foi comprovada pela presença do sinal do protão H-15 (septeto) característico deste tipo de compostos.

De acordo com todos os ensaios realizados a planta da espécie *P. mutabilis* demonstrou ter potencial bioativo que deve ser futuramente estudado. Estudos futuros devem focar-se no isolamento, identificação e caracterização biológica dos compostos responsáveis pela bioatividade apresentada.

Este estudo confirma o interesse na obtenção de novos fármacos a partir de uma fonte de origem natural como é o género *Plectranthus*.

Bibliografia

- Abdissa, N., Frese, M. & Sewald, N. (2017). Antimicrobial Abietane-Type Diterpenoids from *Plectranthus punctatus*. *Molecules*, 22, 1919. <https://doi.org/10.3390/molecules22111919>
- Alasbahi, R. H., & Melzig, M. F. (2010). *Plectranthus barbatus*: A Review of Phytochemistry, Ethnobotanical Uses and Pharmacology – Part 1. *Planta Medica*, 76, 753–765. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240898>
- Alvarenga, S. A. V, Gastmans, J. P., Rodrigues, G. D., Moreno, P. R. H., & Emerenciano, V. D. (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)
- Alves, C., David, J., David, J., Bahia, M. & Aguiar, R. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim. Nova*, 33(10), 2202–2210. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>
- Alves, E., Vinholis, A., Casemiro, L., Furtado, N., Silva, M., Cunha, W., et al., (2008). Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. *Quim. Nova*, 31(5), 1224–1229. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422008000500052>
- Amarante, C. B., Müller, A. H., Póvoa, M. M., & Dolabela, M. F. (2011). Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*). *Acta Amazonica*, 41(3), 431–434. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672011000300015>
- Amina, M., Alam, P., Parvez, M. K., Al-Musayeib, N. M., Al-Hwaity, S. A., Al-Rashidi, N. S., et al., (2018). Isolation and validated HPTLC analysis of four cytotoxic compounds, including a new sesquiterpene from aerial parts of *Plectranthus cylindraceus*. *Natural Product Research*, 32(7), 804–809. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1363750>
- 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>
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5–16. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf083>
- Aprotosoiaie, A. C., Răileanu, E., Trifan, A., & Cioanca, O. (2013). The polyphenolic content of common *lamiaceae* species available as herbal tea products in Romanian pharmacies. *Revista Medico-Chirurgicala a Societatii de Medici Si Naturalisti Din Iasi*, 117(1), 233–

7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24505921>
- Arumugam, G., Swamy, M. K., & Sinniah, U. R. (2016). *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. *Molecules*, 21(4). <https://doi.org/10.3390/molecules21040369>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., et al., (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Babiaka, S. B., Ntie-Kang, F., Lifongo, L. L., Ndingkokhar, B., Mbah, J. A., & Yong, J. N. (2015). The chemistry and bioactivity of Southern African flora I: A bioactivity versus ethnobotanical survey of alkaloid and terpenoid classes. *RSC Advances*, 5(54), 43242–43267. <https://doi.org/10.1039/c5ra01912e>
- Baghel, S. S., Shrivastava, N., Baghel, R. S., & Rajput, S. (2012). A review of Quercetin : Antioxidant and Anticancer Properties. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 146–160.
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., & Azizi, F. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: A review. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-43>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Abdel-Mogib, M., Albar, H. A. & Batterjee, S. M. (2002). Chemistry of the Genus *Plectranthus*. *Current Organic Chemistry*, 4(10), 271–301. <https://doi.org/10.3390/70200271>
- Becerra, J., Flores, C., Mena, J., Aqueveque, P., Alarcón, J., Bittner, M., et al., (2002). Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of *Chilean podocarpaceae*. *Boletín de La Sociedad Chilena de Química*, 47(2), 151–157. <https://doi.org/10.4067/S0366-16442002000200011>
- Bercu, R. (2013). Comparative Anatomy of Two *Lamiaceae* Species, XVIII(1), 232–238.
- Bhatt, R., Mishra, N., & Bansal, P. K. (2013). Phytochemical, Pharmacological and Pharmacokinetics Effects of Rosmarinic Acid. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*, 2(2), 28–34. <https://doi.org/10.7897/2277-4572.02215>
- Bohlmann, J., & Gershenzon, J. (2009). Old substrates for new enzymes of terpenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(26), 10402–10403.

- <https://doi.org/10.1073/pnas.0905226106>
- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., & Croteau, R. (1998). Plant terpenoid synthases: Molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4126–4133. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.8.4126>
- Bolton, J. L. (2014). Quinone Methide Bioactivation Pathway: Contribution to Toxicity and/or Cytoprotection? *Current Organic Chemistry*, 61-69. <https://doi.org/10.2174/138527281801140121123046>
- Bona, E. A. M., Pinto, F. G. S., Fruet, T. K., Jorge, T. C. M., & Moura, A. C. (2014). Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos Do Instituto Biológico*, 81(3), 218–225. <https://doi.org/10.1590/1808-1657001192012>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A. & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *World Health Organization (WHO)*, 107(11), 843–847. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brito, E., Gomes, E., Falé, P. L., Pacheco, R., Teixeira, V., Ascensão, L., et al., (2018). Bioactivities of decoctions from *Plectranthus* species related to their traditional use on the treatment of digestive problems and alcohol intoxication. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.006>
- Brits, G. J., Selchau, J., & Deuren, G. (2001). Indigenous *Plectranthus* (*Lamiaceae*) from south Africa as new flowering pot plants. *Proc. XX EUCARPIA Symp. on New Ornamentals*, 165–170.
- 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. *Phytomedicine*, 22(11), 1009–1016. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.06.013>
- Burmistrova, O., Simões, M. F., Rijo, P., Quintana, J., Bermejo, J., & Estévez, F. (2013). Antiproliferative activity of abietane diterpenoids against human tumor cells. *Journal of Natural Products*, 76(8), 1413–1423. <https://doi.org/10.1021/np400172k>
- 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 and Medicinal Chemistry*, 12(1), 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2003.10.006>

- Chang, J., Xu, J., Li, M., Zhao, M., Ding, J., & Zhang, J. S. (2005). Novel cytotoxic seco-abietane rearranged diterpenoids from *Salvia prionitis*. *Planta Medica*, 71(9), 861–866. <https://doi.org/10.1055/s-2005-871279>
- Chaturvedi, A. K., Parmar, S. S., Nigam, S. K., Bhatnagar, S. C., Misra, G. & Sastry, B.V. R. (1976). Anti-inflammatory and anticonvulsant properties of some natural plant triterpenoids. *Elsevier*, 8, 199-210. [https://doi.org/10.1016/0031-6989\(76\)90009-6](https://doi.org/10.1016/0031-6989(76)90009-6)
- Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Chen, J., Wu, H., Peng, C., Chen, I., Chu, S. (2009). Seco-Abietane Diterpenoids, a Phenylethanoid Derivative, and Antitubercular Constituents from *Callicarpa pilosissima*. *J. Nat. Prod.*, 223–228.
- Clinical & Laboratory Standards Institute. (2003). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada — 8ª Edição. *Anvisa* (Vol. 23). http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf
- Codd, L. E. (1975). *Plectranthus* (Labiatae) and allied genera in Southern Africa. *Bothalia*, 11(4), 371–442. <https://doi.org/10.4102/abc.v11i4.1482>
- Codd, L. E. (1984). The genus *Isodon* (Schrader ex Benth.) Spach in Africa and a new genus *Rabdosiella* Codd (Lamiaceae). *Bothalia*, 15(1 & 2). <https://doi.org/10.4102/abc.v15i1/2.1105>
- Cowan, M. M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–82. [https://doi.org/0893-8512/99/\\$04.00+0](https://doi.org/0893-8512/99/$04.00+0)
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure and Applied Chemistry*, 77(1), 7–24. <https://doi.org/10.1351/pac200577010007>
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(6), 3670–3695. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- Cretton, S., Saraux, N., Monteillier, A., Righi, D., Marcourt, L., Genta-Jouve, G., et al., (2018). Anti-inflammatory and antiproliferative diterpenoids from *Plectranthus scutellarioides*. *Phytochemistry*, 154(March), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.06.012>
- Dandawate, P. R., Vyas, A. C., Padhye, S. B., Singh, M. W., & Baruah, J. B. (2010). Perspectives on Medicinal Properties of Benzoquinone Compounds. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 436–454.

- 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>
- Dellar, J. E., Cole, M. D., Waterman, P. G., & Street, G. (1996). Antimicrobial abietane diterpenoids from *Plectranthus elegans*. *Phytochemistry*, 41(3), 735–738. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00694-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00694-X)
- Devappa, R. K., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2011). Jatropha diterpenes: A review. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 301–322. <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1720-9>
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach Second Edition*. John Wiley & sons Ltd. New York. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.01.005>
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach*. (L. John Wiley & Sons, Ed.) (3rd ed.).
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery, 303–336. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>
- Dombo, A., Costa, E., & Neto, G. (2002). Malawi Plant Red Data List. *National Red List*, 34–42.
- Doughari, J. H. (2012). Phytochemicals: Extraction Methods, Basic Structures and Mode of Action as Potential Chemotherapeutic Agents in Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health. *Intech Open*, 1–32.
- Downes, E., & Darbyshire, I. (2018). *Coleus namuliensis* and *Coleus caudatus* (*Lamiaceae*): a new species and a new combination in the Afromontane flora of Mozambique and Zimbabwe. *Blumea*, 168–173. <https://doi.org/10.3767/blumea.2017.62.03.02>
- Dumitrascu, M. (2011). *Artemia salina*. *Balneo-Research Journal*, 2(4), 119–122. <https://doi.org/10.12680/balneo.2011.1022>
- Falé, P., Borges, C., Madeira, P., Ascensão, L., Araújo, M. E., 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>
- Fan, S., Zeng, H., Pei, Y., Li, L., Ye, J., Pan, Y., et al., (2012). The anti-inflammatory activities of an extract and compounds isolated from *Platycladus orientalis* (*Linnaeus*) Franco in

- vitro and ex vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(2), 647–652.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.019>
- Fieser L., Berliner, E., Bondhus, F., Chang, F., Dauben, W., Ettlinger, M., et al., (1948). Naphthoquinone Antimalarials. *Journal of the American Chemical Society*, 70(10), 3174–3215. <https://doi.org/10.1021/ja01190a004>
- Figueiredo, M. R., Kaplan, M. A., & Gottlieb, O. R. (1995). Diterpenes , taxonomic markers ? *Plant Systematics and Evolution*, 195, 149–158.
- Figueiredo, N. L., Aguiar, S. R., Falé, P. L., Ascensão, L., Serralheiro, M. L., & Lino, A. R. (2010). The inhibitory effect of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus ecklonii* leaves on the viability, glucosyltransferase activity and biofilm formation of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Food Chemistry*, 119(2), 664–668. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.008>
- Foti, M. C. (2007). Antioxidant properties of phenols. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1673–1685. <https://doi.org/10.1211/jpp.59.12.0010>
- Freitas, T. A. & Rodrigues, A. C. (2006). Etnobotânica das plantas medicinais de Madre de Deus, Bahia. *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, 6(2), 133–137.
- Gabay, O., Sanchez, C., Salvat, C., Chevy, F., Breton, M., Nourissat, G., et al., (2010). Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthritis and Cartilage*, 18(1), 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.08.019>
- Garcia, C., Silva, C. O., Monteiro, C. M., Nicolai, M., Viana, A. & Andrade, J. M. (2018a). Anticancer properties of the abietane diterpene 6,7-dehydroroyleanone obtained by optimized extraction. *Future Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0239>
- Garcia, C., Teodósio, C., Oliveira, C. I., Oliveira, C., Diaz-Lanza, A., Reis, C., et al., (2018b). Naturally occurring *Plectranthus*-derived diterpenes with antitumoral activities. *Current Pharmaceutical Design*, 1–30. <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., & Rodríguez, B. (2004). Further Labdane and Kaurane Diterpenoids and Other Constituents from *Plectranthus fruticosus*. *Journal of Natural Products*, 67(4), 614–621. <https://doi.org/10.1021/np030490j>

- 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>
- Gnankiné, O., & Bassolé, I. (2017). Essential oils as an alternative to pyrethroids' resistance against anopheles species complex giles (Diptera: Culicidae). *Molecules*, 22(10). <https://doi.org/10.3390/molecules22101321>
- González, M. A. (2014). Synthetic derivatives of aromatic abietane diterpenoids and their biological activities. *European journal of medicinal chemistry*, 87, 834-842. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.023>
- González, M. A. (2015). Aromatic abietane diterpenoids: their biological activity and synthesis. *Natural Product Reports*, 32(5), 684–704. <https://doi.org/10.1039/c4np00110a>
- Grayer, J., Eckert, M. R., Veitch, N. C., Kite, G. C., Marin, P. D., Kokubun, T., Simmonds, M. S. & Paton, A. J. (2003). The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters , nepetoidins A and B , in the Lamiaceae, 64, 519–528. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00192-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00192-4)
- 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(3), 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2010.01.014>
- Greenwell, M. & Rahman, P. K. (2015). Medicinal Plants : Their Use in Anticancer Treatment. *Europe PMC Funders Group*, 6(10), 4103–4112. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(10\).4103-12.Medicinal](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(10).4103-12.Medicinal)
- Guédouar, H., Aloui, F., Beltifa, A., Ben Mansour, H., & Ben Hassine, B. (2017). Synthesis and characterization of phenanthrene derivatives with anticancer property against human colon and epithelial cancer cell lines. *Comptes Rendus Chimie*, 20(8), 841–849. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2017.03.008>
- Gurlal, P. (2005). Testing for microbiologically active compounds extracted from members of the family Lamiaceae and other indigenous plants. Tese apresentada à escola de Bioquímica, Genética, Microbiologia e Patologia das plantas da Universidade de KwaZulu-Natal para obtenção do grau de mestre, orientada por M. D. Laing, Pietermaritzburg, África do Sul.
- Hack, D., Blümel, M., Chauhan, P., Philipps, A. R., & Enders, D. (2015). Catalytic Conia-ene and related reactions. *Chemical Society Reviews*, 44(17), 6059–6093. <https://doi.org/10.1039/c5cs00097a>

- Hamidi, M., Jovanova, B., & Panovska, T. (2014). Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L .) model. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 60(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.01.002>
- Hayashi, T., Smith, F. T., & Lee, K. (1987). Antitumor Agents. Psychorubrin, a New Cytotoxic Naphthoquinone from *Psychotria rubra* and Its Structure-Activity Relationships. *J. Med. Chem*, 2005–2008.
- Hitchcock, A. (1990). A Show of *Plectranthus*. *Veld & Flora* (Vol. 76) 25–26.
- Hussein, A. A. (2018). Chemistry of South African Lamiaceae . Part-I: Structures and Biological Activity of Terpenoids 1, 1–28. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.77399>
- IDEXX Laboratories. (2017). Microbiology guide to interpreting minimum inhibitory concentration (MIC). *Diagnostic Update*. [https://cdn2.hubspot.net/hubfs/413558/09-67064-01 Microbiology Guide Update_V2_L.pdf?t=1489092481255](https://cdn2.hubspot.net/hubfs/413558/09-67064-01%20Microbiology%20Guide%20Update_V2_L.pdf?t=1489092481255)
- Jaarsveld, E. (1981). Suid-Afrikaanse *Plectranthus* spesies as tuinplante (deel 2). *Veld & Flora*.
- Jaarsveld, E. J., & Ards, T. J. E. (1997). Notes on *Plectranthus* (Lamiaceae) from southern Africa. *Bothalia*, 27, 1–6.
- Jaarsveld, E. (2006). The southern african *Plectranthus* and the art of turning shade to glade. Fernwood Press, Simon's Town.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2017). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.01>
- Jian, B., Zhang, H., & Liu, J. (2018). Structural diversity and biological activities of diterpenoids derived from *euphorbia fischeriana* steud. *Molecules*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/molecules23040935>
- Jordheim, M., Calcott, K., Gould, K. S., Davies, K. M., Schwinn, K. E., & Andersen, O. M. (2016). High concentrations of aromatic acylated anthocyanins found in cauline hairs in *Plectranthus ciliatus*. *Phytochemistry*, 128, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.04.007>
- Jorgensen, J. & Ferraro, M. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Infectious Diseases Society of America*, 49, 1749. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Kalauni, S. K., Awale, S., Tezuka, Y., Banskota, A. H., Linn, T. Z., Asih, P. B. S., et al., (2006). Antimalarial activity of cassane- and norcassane-type diterpenes from *Caesalpinia crista* and their structure-activity relationship. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(5),

- 1050–2. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.1050>
- Kapewangolo, T. P. (2013). *Lamiaceae* plant extracts and isolated compounds demonstrate activity against HIV/AIDS. Tese apresentada ao departamento de Bioquímica da Universidade da Pretoria para obtenção do grau de doutor, orientada por Debra Meyer, Pretoria.
- Khalik, K. N. A. (2016). A Systematic Revision of the Genus *Plectranthus* L. (Lamiaceae) in Saudi Arabia Based on Morphological , Palynological , and Micromorphological Characters of Trichomes, (July), 1429–1444. <https://doi.org/10.4236/ajps.2016.710137>
- Kovács, A., Vasas, A., & Hohmann, J. (2008). Natural phenanthrenes and their biological activity. *Phytochemistry*, 69(5), 1084–1110. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.12.005>
- Kubínová, R., Švajdlenka, E., Schneiderová, K., Hanáková, Z., Dall’Acqua, S., & Farsa, O. (2013). Polyphenols and diterpenoids from *Plectranthus forsteri* “Marginatus.” *Biochemical Systematics and Ecology*, 49, 39–42. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.03.029>
- Kulkarni, R. R., Shurpali, K., Gawde, R. L., Sarkar, D., Puranik, V. G., & Joshi, S. P. (2012). Phyllocladane diterpenes from *Anisomeles heyneana*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 14(12), 1162–1168. <https://doi.org/10.1080/10286020.2012.738672>
- Kuzuyama, T., & Seto, H. (2003). Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Natural Product Reports*, 20(2), 171–183. <https://doi.org/10.1039/b109860h>
- Ladeiras, D., Monteiro, C., Pereira, F., Reis, C., Afonso, C., & Rijo, P. (2016). Reactivity of Diterpenoid Quinones: Royleanones. *Current Pharmaceutical Design*, 22(12), 1682–1714. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151211094521>
- Lanzotti, V. (2013). Diterpenes for Therapeutic Use. *J.M. Mérillon (Eds.), Natural Products*, 3173–3191. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_192
- Le Roux, K., Prinsloo, L. C., & Meyer, D. (2015). Cellular injury evidenced by impedance technology and infrared microspectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 138, 321–330. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.11.089>
- 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., Koo, T., Hwang, B. & Lee, J. J. (2002). *Kaurane diterpene, kamebakaurin inhibits NF- κ B by directly targeting DNA-binding activity of p50 and blocks the expression of*

- antiapoptotic NF- κ B target genes*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201368200>
- Li, J., Guo, W. J., & Yang, Q. Y. (2002). Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World Journal of Gastroenterology*, 8(3), 493–495. <https://doi.org/10.3748/wjg.v8.i3.493>
- Lovkova, M. Ya., Buzuk, G. N., Sokolova, S. M. & Kliment'eva, N. I. (2001). Chemical Features of Medicinal Plants (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37, 229–237.
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M. I. (2017). *Terpenoids Pharmacognosy. Chapter 11*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00011-1>
- Lukhoba, C. W., Simmonds, M. S. J., & Paton, A. J. (2006). *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses, 103, 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.011>
- Martens, S., & Mithöfer, A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 66(20), 2399–2407. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.07.013>
- Mason, T., Chemat, F., & Vinatoru, M. (2011). The Extraction of Natural Products using Ultrasound or Microwaves. *Current Organic Chemistry*, 15(2), 237–247. <https://doi.org/10.2174/138527211793979871>
- Matias, D., Nicolai, M., Saraiva, L., Pinheiro, R., Faustino, C., Lanza, A., et al., (2019). Cytotoxic Activity of Royleanone Diterpenes from *Plectranthus madagascariensis* Benth. *ACS Omega*, 4, 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)
- McGaw, L. J., Lall, N., Meyer, J. J. M., & Eloff, J. N. (2008). The potential of South African plants against Mycobacterium infections. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 482–500. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.022>
- Mendanha, S. A., Moura, S. S., Anjos, J. L. V., Valadares, M. C., & Alonso, A. (2013). Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicology in Vitro*, 27(1), 323–329. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.08.022>
- 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>

- Merritt, A. T. & Ley, S. V. (1992). Clerodane diterpenoids. *Natural Product Reports*, 243–287.
<https://doi.org/10.1039/NP9920900243>
- Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2017). *Chemistry of Essential Oils and Factors Influencing Their Constituents. Soft Chemistry and Food Fermentation*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811412-4.00013-8>
- Moreira, L., Santos, T., Doria, A., Figueira, F., Sorge, C., Moraes, A., et al., (2017). Estudo da resistência aos antifúngicos e leveduras isoladas de candidúrias de um hospital de médio porte, 44–52.
- Mota, L., Figueiredo, C., Pedro, L. G., Barroso, J. G., Miguel, M. G., Faleiro, L., et al., (2014). Volatile-Oils Composition, and Bioactivity of the Essential Oils of *Plectranthus barbatus*, *P. neochilus*, and *P. ornatus* Grown in Portugal. *Chemistry and Biodiversity*, 11, 719–732.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbdv.201300161>
- Mothana, R., Khaled, J., Noman, O., Kumar, A., Alajmi, M., Al-Rehaily, A., et al., (2018). Phytochemical analysis and evaluation of the cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from three *Plectranthus* species grown in Saudi Arabia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 1–10.
- Mottram, R. (2014). Hortax Index to Flowering Plants of Africa (compiler). Chronological list of plates and their authors.
- 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>
- Mukul, S., Uddin, M. & Tito, M. (2007). Medicinal plant diversity and local healthcare among the people living in and around a conservation area of northern Bangladesh. *Int. J. For. Usuf. Mngt.*
- Naghibi, F., Mosaddegh, M., & Motamed, S. M. (2014). Labiatae Family in Folk Medicine in Iran : from Ethnobotany to Pharmacology, (May).
- Narukawa, Y., Shimizu, N., Shimotohno, K., & Takeda, T. (2001). Two new diterpenoids from *Plectranthus nummularius* Briq. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 49(9), 1182–1184.
<https://doi.org/10.1248/cpb.49.1182>
- Nascimento, F. R., Albuquerque, K. R. S., Oliveira, M. R., Pizziolo, V. R., Brasileiro, B. G., Diaz, G., et al., (2017). Antibiotic activity of *plectranthus ornatus* codd., a traditional medicinal plant. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 89(3), 2461–2469.
<https://doi.org/10.1590/0001-3765201720170068>

- Neto, Í., Faustino, C., & Rijo, P. (2015). Antimicrobial abietane diterpenoids against resistant bacteria and biofilms. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science. Technological Advances and Educational Programs, I*, 15–26.
- Nicolai, M., Pereira, P., Vitor, R. F., Reis, C. P., Roberto, A., & Rijo, P. (2016). Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants. *Measurement: Journal of the International Measurement Confederation*, 89, 328–332. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2016.04.033>
- Nsimba, R. Y., Kikuzaki, H., & Konishi, Y. (2008). Ecdysteroids act as inhibitors of calf skin collagenase and oxidative stress. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 22(4), 240–250. <https://doi.org/10.1002/jbt.20234>
- Ntie-Kang, F., Onguéné, P. A., Lifongo, L. L., Ndom, J. C., Sippl, W., & Mbaze, L. M. A. (2013). The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants, part II: A pharmacological evaluation of non-alkaloids and non-terpenoids. *Malaria Journal*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-81>
- Ntungwe, E., Marçalo, J., Garcia, C., Reis, C., Teodósio, C., Oliveira, C., et al., (2017). Biological activity screening of seven *Plectranthus* species. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 14(1), 95–108. <https://doi.org/10.19277/BBR.14.1.153>
- Ntungwe, E., Soares, J., Garcia, C., Teodósio, C., Oliveira, C. I., Oliveira, C. S., et al., (2018). *7 α -Acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone* from *Plectranthus ramosior*: a screening study for anticancer lead molecules. *Planta medica, In preparation*.
- Nyila, M.A., Leonard, C.M., Hussein, A.A. & Lall, N., 2009. Bioactivities of *Plectranthus ecklonii* constituents. *Nat. Prod. Commun.* 4, 1177–1180. <https://doi.org/10.1177/1934578X0900400903>
- Odjakova, M., Popova, E., Sharif, M. Al, & Mironova, R. (2012). Plant-Derived Agents with Anti-Glycation Activity. <https://doi.org/10.5772/48186>
- Ogbole, O. O., Segun, P. A., & Adeniji, A. J. (2017). In vitro cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on Rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 494. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2005-8>
- 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>
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas,

- B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 301–307.
- 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>
- Parra, A. L., Yherba, R. S., Sardinias, I. G., & Buela, L. I. (2001). Comparative study of the assay of and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395–400. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>
- Paton, A., Mwanyambo, M. & Culham, A. (2018). Phylogenetic study of *Plectranthus*, *Coleus* and allies (*Lamiaceae*): taxonomy, distribution and medicinal use, 1–22. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy064>
- Paton, A. J., Springate, D., Suddee, S., Otieno, D., Grayer, R. J., Harley, M. M., et al., (2004). Phylogeny and evolution of basil and allies (Ocimeae, Labiatae) based on three plastid DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(1), 277–299. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.08.002>
- Pereira, M., Matias, D., Pereira, F., Reis, C., Simões, M. F., & Rijo, P. (2015). Antimicrobial screening of *Plectranthus madagascariensis* and *P. neochilus* extracts. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 12(1), 127–138. <https://doi.org/10.19277/BBR.12.1.111>
- Pires, J., Torres, P. B., Santos, D. & Chow, F. (2017). Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. *Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo*, (January), 6. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.27450.08640>
- 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>
- Potgieter, C. J. (2009). Pollination of *Plectranthus* L'Hér. (*Lamiaceae*) along the Eastern seaboard of southern Africa. Tese apresentada à Escola das Ciências Biológicas e da Conservação da Universidade de KwaZulu-Natal para a obtenção do grau de doutor, orientada por T. J. Edwards, Pietermaritzburg.
- Potgieter, C. J., Edwards, T. J., & Staden, J. (2009). Pollination of *Plectranthus* spp. (

- Lamiaceae) with sigmoid flowers in southern Africa. *South African Journal of Botany*, 75(4), 646–659. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2009.07.009>
- Prakash, V. (2017). Terpenoids As Source of Anti-Inflammatory Compounds. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 10(3), 68. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i3.16435>
- Prasad, N., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., & Reddy, B. (2011). Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 349(1–2), 11–19. <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0655-7>
- Qazi, A. M., & Molvi, I. K. (2016). Herbal Medicine: A Comprehensive Review. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 8(2), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.001>
- Qi, X. L., Zhang, Y. Y., Zhao, P., Zhou, L., Wang, X. B., Huang, X. X., et al., (2018). Ent-Kaurane Diterpenoids with Neuroprotective Properties from Corn Silk (*Zea mays*). *Journal of Natural Products*, 81(5), 1225–1234. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b01017>
- Rabe, T., & Van Staden, J. (1998). Screening of *Plectranthus* species for antibacterial activity. *South African Journal of Botany*, 64(1), 62–65. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30834-6](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30834-6)
- Radulović, N., Denić, M., & Stojanović-Radić, Z. (2010). Antimicrobial phenolic abietane diterpene from *Lycopus europaeus* L. (Lamiaceae). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(17), 4988–4991. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.063>
- Rajabi, S., Ramazani, A., Hamidi, M., & Naji, T. (2015). *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s40199-015-0105-x>
- Rahman, S., Ismail, M., Khurram, M., Ullah, I., Rabbi, F., & Iriti, M. (2017). Bioactive Steroids and Saponins of the Genus *Trillium*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(12). <https://doi.org/10.3390/molecules22122156>
- Ramawat, K. & Merillon, J. (2008). Drug Discovery from Plants. *Bioactive Molecules and Medicinal Plants*, 1–25. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-540-74603-4>
- Ramu, G., Mohan, G. K., Jayaveera, K. N., Dhanapal, S. P., & Senthilkumar, G. (2012). Preliminary phytochemical and antioxidant study of hydroalcoholic extracts from selected genera of Indian Lamiaceae. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2 SUPPL.),

- S685–S688. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60296-2](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60296-2)
- Ray, P., Huang, B., & Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*, 981–990. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008>
- Rech, A. R., Agostini, K., Oliveira, P. E., & Machado, I. C. (2014). Biologia da Polinização, 1ª edição(JANUARY 2014). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3303.6327>
- Rice-evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant acitivity relationships of flavonoids and phenolic acids. *ELSEVIER*, 20, 933–956. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02227-9](https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02227-9)
- Rice, L. J., Brits, G. J., Potgieter, C. J., & Van Staden, J. (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., Batista, M., Matos, M., Rocha, H., Jesus, S. & Fátima Simões, M. (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*, 922–931.
- Rijo, P., Gaspar-Marques, C., Simões, M. F., Duarte, A., Apreda-Rojas, M. C., Cano, F. H., et al., (2002). Neoclerodane and labdane diterpenoids from *Plectranthus ornatus*. *Journal of Natural Products*, 65(10), 1387–1390. <https://doi.org/10.1021/np020203w>
- Rijo, P., Gaspar-Marques, C., Simões, M., Jimeno, M. & Rodríguez, B. (2007). Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P . grandidentatus*, 35, 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.10.011>
- Rijo, P., Rodriguez, B., Duarte, A., & Simões, M. F. (2011). Antimicrobial Properties of *Plectranthus ornatus* Extracts, 11-acetoxyhalima-5, 13-dien-15-oic Acid Metabolite and its Derivatives. *The Natural Products Journale*, 1(1), 57–64.

- <https://doi.org/10.2174/2210315511101010057>
- 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>
- Rijo, P., Simões, M. F., & Rodríguez, B. (2005). Structural and spectral assignment of three forskolin-like diterpenoids isolated from *Plectranthus ornatus*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(7), 595–598. <https://doi.org/10.1002/mrc.1600>
- Roncero, A. M., Tobal, I. E., Moro, R. F., Díez, D., & Marcos, I. S. (2018). Halimane diterpenoids: sources, structures, nomenclature and biological activities. *Natural Product Reports*, 35(9), 955–991. <https://doi.org/10.1039/c8np00016f>
- 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. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 12(1), 59–67. <https://doi.org/10.19277/BBR.12.1.104>
- Saeed, M. E. M., Meyer, M., Hussein, A., & Efferth, T. (2016). Cytotoxicity of South-African medicinal plants towards sensitive and multidrug-resistant cancer cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 186(April), 209–223. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.005>
- Saito, Y., Goto, M., & Nakagawa-Goto, K. (2018). Total Synthesis of Antiproliferative Parvifloron F. *Organic Letters*, 20(3), 628–631. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b03763>
- Santos, F., Ramos, M. & Miyagusku, L. (2017). Antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts from genipap, baru and taruma, 6–11. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20160252>
- Sarkar, A., Das, R., & Kar, G. (2018). Thiophene Analogue of Isotanshinone-II Nucleus: A Novel Approach towards the Synthesis of Phenanthro[4,3- *b*]-thiophene-4,5-dione and Phenanthro[3,4- *b*]thiophene-4,5-dione Derivatives. *ChemistrySelect*, 3(41), 11422–11426. <https://doi.org/10.1002/slct.201802652>
- Sasaki, K., Abe, H., & Yoshizaki, F. (2002). In Vitro Antifungal Activity of Naphthoquinone Derivatives. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 25(5), 669–670. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.669>
- Semenya, S. S., Potgieter, M. J., & Erasmus, L. J. C. (2012). Ethnobotanical survey of medicinal plants used by Bapedi traditional healers to manage HIV/AIDS in the Limpopo Province,

- South Africa. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(8), 434–441.
<https://doi.org/10.5897/JMPR012.727>
- Semenya, S. S., Potgieter, M. J., & Erasmus, L. J. C. (2013). Indigenous plant species used by Bapedi healers to treat sexually transmitted infections: Their distribution, harvesting, conservation and threats. *South African Journal of Botany*, 87, 66–75.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.03.001>
- Silveira, L., Olea, R., Mesquita, J., Cruz, A., & Mendes, J. (2009). Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 90(2), 124–128.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Sierra-Pérez, R., González-Canavaciolo, V., Marrero-Delange, D. & Rodríguez-Leyes, E. (2012). Lamiaceae: una revisión sobre sus efectos neurofarmacológicos y su presencia en Cuba. *Centro Nacional de Investigaciones Científicas*, 44(1).
<http://revista.cnice.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB13-12.pdf>
- Silva, C. O., Molpeceres, J., Batanero, B., Fernandes, A. S., Saraiva, N., Costa, J. G., et al., (2016). Functionalized diterpene parvifloron D-loaded hybrid nanoparticles for targeted delivery in melanoma therapy. *Therapeutic Delivery*, 521–544.
<https://doi.org/10.4155/tde.15.92>
- Simões, M. F., Rijo, P., Duarte, A., Barbosa, D., Matias, D., Delgado, J., et al., (2010b). Two new diterpenoids from *Plectranthus* species. *Phytochemistry Letters*, 3(4), 221–225.
<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2010.08.002>
- Simões, M. F., Rijo, P., Duarte, A., Matias, D., & Rodríguez, B. (2010a). An easy and stereoselective rearrangement of an abietane diterpenoid into a bioactive microstegiol derivative. *Phytochemistry Letters*, 3(4), 234–237.
<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2010.09.001>
- Singh, I. (2017). Antimicrobials in Higher Plants: classification, mode of action and bioactivities. *Chemical Biology Letters*, 4(1), 48–62.
<http://pubs.thesciencein.org/journal/index.php/cbl/article/view/47>
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., Vistica, D., Warren, J. T., et al., (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990 Jul 4, 82(13), 1107–1112. <https://doi.org/10.1093/jnci/82.13.1107>

- Soares, J., Pereira, N. A., Monteiro, Â., Leão, M., Bessa, C., Santos, D. J., et al., (2015). Oxazoloisoindolinones with in vitro antitumor activity selectively activate a p53-pathway through potential inhibition of the p53-MDM2 interaction. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(October), 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.10.006>
- Sun, H., Fang, W. S., Wang, W. Z., & Hu, C. (2006). Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids. *Botanical Studies*, 47(4), 339–368.
- Taguchi, K., Kumagai, Y., Endo, A., Kikushima, M., Ishii, Y. & Shimojo, N. (2001). Phenanthraquinone Affects Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity through Modification of the Thiol Group: An Alternative inhibition Mechanism. *Journal of Health Science*, 47(6), 571–574.
- Teixeira, A. P., Batista, O., Simões, M. F., Nascimento, J., Duarte, A., De La Torre, M. C., et al., (1997). Abietane diterpenoids from *Plectranthus grandidentatus*. *Phytochemistry*, 44(2), 325–327. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00467-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00467-0)
- Tomei, R. R. & Salvador, M. J. (2005). Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. *XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade Do Vale Do Paraíba 1963*, 1963–1967.
- Tóth, B., Hohmann, J., & Vasas, A. (2018). Phenanthrenes: A Promising Group of Plant Secondary Metabolites. *Journal of Natural Products*, 81(3), 661–678. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00619>
- Velazquez, D. (1997). Clave para los generos de *Lamiaceae* en Venezuela. *Fundación Instituto Botánico de Venezuela (FIBV)*, 20(1), 01-41.
- Viljoen, A. M., Demirci, B., Başer, K. H. C., Potgieter, C. J., & Edwards, T. J. (2006). Microdistillation and essential oil chemistry-a useful tool for detecting hybridisation in *Plectranthus* (Lamiaceae). *South African Journal of Botany*, 72(1), 99–104. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2005.05.003>
- Vipra, A., Desai, S. N., Junjappa, R. P., Roy, P., Poonacha, N., Ravinder, P., et al., (2013). Determining the Minimum Inhibitory Concentration of Bacteriophages: Potential Advantages. *Advances in Microbiology*, 3, 181–190. <https://doi.org/10.4236/aim.2013.32028>
- 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>
- Wang, S. Y., Wu, J. H., Shyur, L. F., Kuo, Y. H., & Chang, S. T. (2002). Antioxidant activity of abietane-type diterpenes from heartwood of *Taiwania cryptomerioides* Hayata. *Holzforschung*, 56(5), 487–492. <https://doi.org/10.1515/HF.2002.075>
- Wang, W. X., Zhu, J. J., Zou, Y., Hong, Z. L., Liu, S. T., Li, M., et al., (2013). Trichotomone, a new cytotoxic dimeric abietane-derived diterpene from *Clerodendrum trichotomum*. *Tetrahedron Letters*, 54(20), 2549–2552. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.03.048>
- Wang, Y. W., Yang, C. T., Gong, C. L., Chen, Y. H., Chen, Y. W., Wu, K. C., et al., (2015). Inhibition of voltage-gated Na⁺ channels by hinokiol in neuronal cells. *Pharmacological Reports*, 67(6), 1049–1054. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.03.019>
- Wanke, M., Skorupinska-Tudek, K., & Swiezewska, E. (2001). Isoprenoid biosynthesis via 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate/2-Cmethyl-D-erythritol 4-phosphate (DOXP/MEP) pathway. *Acta Biochimica Polonica*, 48(3), 663–671.
- Wansi, J. D., Devkota, K. P., Tshikalange, E., & Kuete, V. (2013). *Diterpenoids from the Medicinal Plants of Africa. Medicinal Plant Research in Africa: Pharmacology and Chemistry*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00014-X>
- Waksmundzka-Hajnos, M. & Sherma, J. (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. Boca Raton: CRC Press, *Chromatographic Science Series*, Vol. 102. <https://doi.org/10.1201/b10320>
- Wellsow, J., Grayer, R. J., Veitch, N. C., Kokubun, T., Lelli, R., Kite, G. C., et al., (2006). Insect-antifeedant and antibacterial activity of diterpenoids from species of *Plectranthus*. *Phytochemistry*, 67(16), 1818–1825. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.02.018>
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Wu, G., Guo, J., Bao, J., Li, X., Chen, X., Lu, J., et al., (2013). Anti-cancer properties of triterpenoids isolated from *Ganoderma lucidum* - a review. *Expert opinion on investigational drugs*, 22, 981-992. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.805202>
- Xu, X. H., Su, Q., & Zang, Z. H. (2012). Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid by RP-HPLC in the leaves of *Eriobotrya japonica* Lindl. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2(3), 238–240. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2012.01.006>
- Zaletova, N. I., Shchavlinskii, A. N., Tolkachev, O. N., Vichkanova, S. A., Fateeva, T. V., Krutikova, N. M., et al., (1987). Preparation of certain derivatives of ursolic acid and their

antimicrobial activity. *Plenum Publishing Corporation*, 345–348.

Anexos

Anexo 1: Artigo de revisão – Naturally Occurring *Plectranthus*-derived Diterpenes with Antitumoral Activities.

Garcia, C., Teodósio, C., Oliveira, C. I., Oliveira, C., Diaz-Lanza, A., Reis, C., et al., (2018).

Naturally occurring *Plectranthus*-derived diterpenes with antitumoral activities. *Current Pharmaceutical Design*, 1–30.

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^{Ab}, Catarina Teodósio^A, Carolina Oliveira^A, Cláudia Oliveira^A, Ana Diaz-Lanza, Catarina Reis^C
and Noélia Duarte^C and Patrícia Rijo^{Aa}

^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.U.Lisboa), Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, 1649-003 Lisboa, Portugal

ARTICLE HISTORY

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

DOI:
10.2174/138161282566190115144241

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.

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 non-tumoral 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, figlianes, ingenanes, lathyranes and jatrophanes) [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