

ANA MARGARIDA RIBEIRINHA ANTÃO

**ESTUDO DE COMPOSTOS BIOACTIVOS E
ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE
Plectranthus ecklonii Benth.**

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Rijo

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

Lisboa

2015

ANA MARGARIDA RIBEIRINHA ANTÃO

**ESTUDO DE COMPOSTOS BIOACTIVOS E
ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE
Plectranthus ecklonii Benth.**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas no curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias/ Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Doutora Patrícia Rijo

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

Lisboa

2015

Escrito segundo as regras do acordo ortográfico de 1945, ao abrigo da Resolução da Assembleia da República n.º 35/2008, publicada em *Diário da República*, 1.ª série — N.º 145 de 29 de Julho de 2008.

I have no special talents.
I am only passionately curious.

— Albert Einstein

Agradecimentos

Quero agradecer a todas as mulheres que, ao longo dos anos, têm entrado na minha vida e me têm mostrado como seguir em frente, como fazer o que por vezes achava impossível, como alcançar objectivos, como ser mais forte. No fundo, como chegar até aqui.

À minha mãe cujo amor incondicional ultrapassa os limites da razão, cuja força me surpreende todos os dias, e por me mostrar que recomeçar do zero, as vezes que forem preciso, não é uma tarefa impossível senão necessária.

À minha avó por todo o carinho, paciência e colo.

Às amigas cuja força, conquistas, inteligência e carácter tanto admiro: Ana Filipa Silva e Maria João Portela.

A elas e às amigas, Andreia Correia, Carla Vilas e Sónia Paramés, obrigado pela amizade e constante disponibilidade.

E à pessoa que mais contribuiu para a realização deste trabalho, a Doutora Patrícia Rijo. Por me ter “dado a mão” mais do que uma vez, pela oportunidade de colaboração que me proporcionou ao longo dos últimos anos e por me ter aberto a “porta” para a investigação. A ela também um muito obrigado pelas palavras de incentivo, pelo apoio, disponibilidade e sorrisos.

Quero ainda agradecer ao meu irmão e melhor amigo, Bruno Antão. Não há palavras suficientes que expressem o quanto me sinto feliz por existires na minha vida.

A todos, Obrigado!

Resumo

O uso de produtos à base de plantas para o tratamento, cura e prevenção de doenças, constitui uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade. De facto, uma fracção significativa das populações dos países em desenvolvimento permanece dependente dos conhecimentos ancestrais sobre plantas para os seus cuidados de saúde. Ainda assim, continua a existir uma lacuna entre os progressos observados na farmácia clínica e os no campo da fitoterapia e da medicina tradicional, continuando muitos produtos naturais com actividade biológica por identificar.

As espécies de *Plectranthus* (família Lamiaceae) têm uma generalizada aplicação etnobotânica, sendo frequentemente citadas as suas propriedades medicinais e aplicação, sobretudo ao nível da medicina popular. A composição rica em compostos antioxidantes e os diversos efeitos apresentados (anti-inflamatório, antimicrobiano e antifúngico), sugerem o *Plectranthus* como um promissor género para a descoberta de compostos medicinais.

Assim, o isolamento dos metabolitos secundários das espécies *Plectranthus* é importante para validar cientificamente os usos populares dessas plantas e também para encontrar novas fontes de produtos com potencial económico, ou compostos que possam ser transformados em princípios activos. Além disso, a avaliação da citotoxicidade dos extractos de plantas e os seus princípios activos são necessários para uma utilização terapêutica eficaz e segura.

Nesta dissertação enumeram-se os 28 compostos isolados até hoje nos extractos da espécie *Plectranthus ecklonii* Benth. e respectivas bioactividades. Os resultados da análise HPLC apresentados fazem parte de um projecto, actualmente a decorrer no CBIOS, sobre identificação, quantificação e avaliação de compostos presentes em diferentes espécies de *Plectranthus*, nomeadamente diterpenos e ácidos hidrocinâmicos.

Palavras-chave: *Plectranthus*; *Plectranthus ecklonii*; Diterpenos; abietanos; Parvifloronas; bioactividade; antioxidante; antimicrobiana; anti-inflamatória; anti-tumoral.

Abstract

The use of herbal products for the treatment, prevention and cure of diseases is one of the oldest human medicinal practices. In fact, a main fraction of population in developing countries remains dependent on ancestral plant knowledge for health care. However, there's still a gap between progress observed in clinical pharmacy and in the field of herbal and traditional medicine, remaining many natural products with biological activity to be identified.

Plectranthus species (Lamiaceae family) have a widespread ethnobotanical use and are often cited by its medicinal properties and application, particularly in folk medicine. They contain many antioxidant compounds and exhibit several effects (anti-inflammatory, antimicrobial and antifungal) which suggest that *Plectranthus* may be a promising genus for the discovery of medicinal compounds.

Thus, the isolation of secondary metabolite compounds from the *Plectranthus* spp. is important to validate scientifically the popular uses of these plants and also to find new sources of potentially economically important products or compounds which can be transformed into active pharmaceutical ingredients. Besides, the cytotoxicity evaluation of the plant extracts and their active ingredients are required for their effective and safe therapeutic use.

This dissertation enumerates the 28 compounds isolated to date from *Plectranthus ecklonii* Benth., extracts and their biological activities. The HPLC analysis presented is part of a project currently ongoing at CBIOS, of identification, quantification and evaluation of the bioactive components, in particular diterpenes and hydrocinnamic acids, in different species of *Plectranthus*.

Keywords: *Plectranthus*; *Plectranthus ecklonii*; Diterpenes; abietanes; Parviflorons; bioactivity; antioxidant; antimicrobial; anti-inflammatory; anti-tumoral.

Abreviaturas, siglas e símbolos

%	Porcentagem
µg	Microgramas
µg/mg	Micrograma por miligrama
µg/ml	Micrograma por mililitro
µM	micromolar
¹ H-RMN -	Ressonância Magnética Nuclear de Protão (espectroscopia)
5-LOX	5-Lipoxigenase
¹³ C RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (espectroscopia)
AA	Ácido araquidônico
ác.	ácido
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AP-1	Activador proteico-1
Benth.	Bentham (botânico inglês)
Briq.	Briquet (botânico suíço)
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
BPH	Hiperplasia benigna da próstata
Caf	Ácido Cafeico
CBIOS	Centro de Investigação em Ciências e Tecnologias da Saúde , ULHT
Clor	Ácido Clorogénico
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
ChE	Colinesterase
CMI	Concentração Mínima Inibitória
COX	Enzima Ciclooxygenase
COX-1	Ciclooxygenase 1
COX-2	Ciclooxygenase 2
DAD	Detector de foto-diodos
decoç.	decoção
DGLA	Ácido dihomo-gama-linoleico

DHFL	Ácido 3,4-dihidroxifenil láctico
DMAPP	Difosfato de dimetilalilo
DPPH	Radical 2,2-difenil-1- picril –hidrazilo
DXP	Deoxixilulose-D-5-fosfato
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EPA	Ácido eicosapentaenóico
Et	Etilo
EtAc	Acetato de etilo
<i>et al.</i>	e outros [autores]
EtOH	Etanol
EUA	Estados Unidos da América
FPP	Farnesilpirofosfato
g	gramas
GGPP	Geranilgeranilpirofosfato
GPP	Geranilpirofosfato
GTF	Glicosiltransferase
GTFs	Glicosiltransferases
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
HeLa	Linhagem celular nomeada obtida de Henrietta Lacks
Hex	Hexano
HIF-1 α	Indutor de hipóxia 1-alfa
HPLC	Cromatografia líquida de alta
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta resolução com detector de foto-diodos
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% da actividade
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1beta
IL-4	Interleucina-4
IL-13	Interleucina-13
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IPP	Isopentenil-pirofosfato
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
LOX	Enzima lipoxigenase
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade

LT	Leucotrienos
LPS	Lipossacarídeo
LPSs	Lipopolissacarídeos
<i>L. major</i>	<i>Leishmania major</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
M	Molar
MAPKs	Proteína-cinases activadas por mitogénos
mARN	Ácido ribonucleico mensageiro
Me	Metilo
MeOH	Metanol
mg	miligramas
mg/g	miligrama por grama
mg/l	miligrama por litro
mg/ml	miligrama por mililitro
MIA PaCa-2	linha celular de adenocarcinoma pancreático
ml	mililitro
ml/min	mililitro por minuto
mM	milimolar
min	minutos
Mix	Mistura
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina
MS	Espectroscopia de massa
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à metilina
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NF-κB	Factor nuclear de transcrição Kapa-beta
nm	nanómetros
nM	nanomolar
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPP	Nerilpirofosfato
nr	não referido
NSCLC	Carcinoma de pulmão de não pequenas células
OH	Grupo Hidroxilo
OTC	Medicamento de venda livre
p53	Gene supressor de tumores
p.a.	partes aéreas (folhas)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Parv D	Parviflorona D
Parv E	Parviflorona E
Parv F	Parviflorona F
<i>P. barbatus</i>	<i>Plectranthus barbatus</i>
p.e.	por exemplo
<i>P. ecklonii</i>	<i>Plectranthus ecklonii</i>
<i>P. falciparum</i>	<i>P. falciparum</i>
PG	Prostaglandina
PGE2	Prostaglandina E2
P.i.	Planta inteira
PKA	Proteíno-cinase A
PKC	Proteíno cinase C
PLA2	Fosfolipase A2
<i>P. madagascariensis</i>	<i>Plectranthus madagascariensis</i>
<i>P. sacatus</i>	<i>Plectranthus sacatus</i>
proIL-1 β	Pró interleucina-1beta
RA	Receptor andrógeno
Ref.	Referência(s)
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies Reactivas de Oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
Rosm	Ácido Rosmarínico
<i>R. solani</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>
SAR	Estudos de relação estrutura-atividade (<i>Structure–Activity Relationship</i>)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. mitis</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
spp.	espécies
<i>S. salivarius</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>S. sanguinis</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>S. sclerotiorum</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<i>S. sobrinus</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>
TNF- α	Factor de necrose tumoral alfa
TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
UV	Ultra-violeta
VEGF	Factor de crescimento endotelial vascular
VRE	<i>Enterococcus faecalis</i> resistente à vancomicina

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Abreviaturas, siglas e símbolos	v
Índice	ix
Índice de Tabelas	xi
Índice de Figuras	xi
Índice de Esquemas	xii
I. INTRODUÇÃO	1
1.1. AS PLANTAS COMO FONTE DE OBTENÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS	1
1.2. GÉNERO <i>Plectranthus</i> L'Hérit	1
1.3. <i>Plectranthus ecklonii</i> Benth.....	2
1.3.1. Usos tradicionais do <i>Plectranthus ecklonii</i> Benth.....	3
II. METABOLITOS SECUNDÁRIOS DO GÉNERO <i>Plectranthus</i>	4
2.1. TERPENOS E BIOSSÍNTESE	4
2.1.1. DITERPENOS	6
2.1.1.1. Diversidade química dos Diterpenos.....	6
2.1.1.2. Diterpenos abietânicos.....	7
2.1.2. TRITERPENOS E ESTERÓIS.....	8
2.2. COMPOSTOS FENÓLICOS.....	10
2.2.1. Ácidos Fenólicos	11
2.2.1.1. Ácido cafeico e derivados do tipo éster.....	12
2.2.2. Flavonóides	13
2.2.2.1. Flavonas e Flavanonas: estrutura e bioactividade.....	14
III. COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Plectranthus ecklonii</i> Benth. E A SUA BIOACTIVIDADE	16
3.1. COMPOSTOS ISOLADOS DE <i>Plectranthus ecklonii</i> Benth.....	20
3.2. BIOACTIVIDADE DOS DITERPENOS ISOLADOS DE <i>P. ecklonii</i> Benth	22
3.2.1. Actividade antimicrobiana.....	22
3.2.1.1. Actividade anti-listeria	23
3.2.1.2. Actividade antiplasmódica.....	24
3.2.2. Actividade antioxidante.....	25
3.2.3. Inibição enzimática: Tirosinase e AChE.....	26
3.2.4. Actividade anti-inflamatória.....	28
3.2.5. Actividade antitumoral	28

3.3. BIOACTIVIDADE DOS TRITERPENOS E ESTERÓIS ISOLADOS DE <i>P. ecklonii</i> Benth.....	29
3.3.1. Bioactividade dos Ácidos Triterpénicos.....	29
3.3.2. Bioactividade dos Esteróis.....	31
3.4. BIOACTIVIDADE DOS ÁCIDOS HIDROCINÂMICOS ISOLADOS DE <i>P. ecklonii</i> Benth.....	31
3.4.1. Actividade antimicrobiana.....	31
3.4.1.1. Actividade anticariogénica.....	32
3.4.2. Actividade antioxidante.....	33
3.4.3. Inibição enzimática da AChE.....	34
3.4.4. Actividade anti-inflamatória.....	34
3.5. BIOACTIVIDADE DOS FLAVONÓIDES ISOLADOS DE <i>P. ecklonii</i> Benth ...	35
3.5.1. Actividade antimicrobiana.....	35
3.5.2. Actividade antioxidante.....	36
3.5.3. Actividade anti-inflamatória.....	38
3.5.4. Actividade antitumoral.....	39
IV. ESTUDO DE QUANTIFICAÇÃO POR HPLC DE DITERPENOS E DE ÁCIDOS FENÓLICOS DE <i>P. ecklonii</i> Benth.	41
4.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1.1. Material Vegetal.....	41
4.1.2. Reagentes.....	41
4.1.3. Metodologias de extracção do material vegetal.....	41
4.1.4. Análise por HPLC e LC-MS.....	41
4.2. RESULTADOS.....	42
4.2.1. Quantificação da Parviflorona D.....	42
4.2.2. Quantificação dos ácidos cafeico, rosmarínico e clorogénico.....	42
4.3. DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	43
V. CONCLUSÕES GERAIS.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	49

Índice de Tabelas

Tabela 1. Compostos isolados de <i>Plectranthus ecklonii</i> Benth.....	17
Tabela 2. Resumo da actividade antimicrobiana apresentada pelos diterpenos abietânicos isolados de <i>P. ecklonii</i> Benth.....	25
Tabela 3. Quantificação por HPLC-DAD de parviflorona D em extractos de <i>P. ecklonii</i> (1 mg).....	42
Tabela 4. Quantificação por HPLC-DAD dos ácidos cafeico (Caf), rosmarínico (Rosm) e clorogénico (Clor) nos extractos de <i>P. ecklonii</i> (concentração 1mg/ml).....	43

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Plectranthus ecklonii</i> 'Medley-Wood' (azul), <i>P. ecklonii</i> 'Tommy' (branco) e <i>P. ecklonii</i> 'Erma' (rosa) (Van Jaarsveld, 2006).	3
Figura 2. Estrutura do isopreno (6) (2-metil-1,3-butadieno) (Dewick, 2002).	4
Figura 3. Diterpenos taxol (7) e forscolina (8) (Salim <i>et al.</i> , 2008; Lanzotti, 2013).....	6
Figura 4. Parvifloronas D (1) , F (2) e E (9) (Onguéné <i>et al.</i> , 2013).....	8
Figura 5. Estrutura geral dos triterpenos pentacíclicos (10) (Xu <i>et al.</i> , 2004).	9
Figura 6. Estrutura química do colesterol (11)	9
Figura 7. Estruturas químicas do ácido ursólico (12) e do ácido oleanólico (13) (Furtado <i>et al.</i> , 2008)	10
Figura 8. β -sitoesterol (14) e estigmasta-5,22(<i>E</i>)-dien-3 β -ol (15) (Syamasundar <i>et al.</i> , 2012).	10
Figura 9. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (17a) e hidroxicinâmicos (17b) (Ângelo & Jorge, 2007).....	11
Figura 10. Ácido clorogénico (16) e ácido cafeico (18) (Dewick, 2009).....	12
Figura 11. Estrutura do ácido rosmarínico (3) (Dewick, 2009).....	12
Figura 12. Nepetoidina A (4) e Nepetoidina B (5) (Kubínová <i>et al.</i> , 2013a).	13
Figura 13. Estrutura e numeração padrão dos flavonóides (Martens & Mithöfer, 2005).	13
Figura 14. A ligação dupla entre C2 e C3 permite distinguir flavonas de flavanonas (Balasundram <i>et al.</i> , 2006).....	14
Figura 15. Estrutura da apigenina (19) e dos seus derivados C-glicosilados (21) e (22) (Choi <i>et al.</i> , 2014)	15

Figura 16. Estruturas químicas das flavonas 5-Hidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona (23) , escutelareina 6,7-dimetil éter (24) e 3',4',5-trihidroxi-6,7-dimetoxi-flavona (26) (Grayer <i>et al.</i> , 2010).....	15
Figura 17. 2 β -(4-hidroxi)benzoiloxi abietano (35) (Simões <i>et al.</i> , 2010).....	23
Figura 18. Dihidotanshinona (36) e criptotanshinona (37) , diterpenos isolados da <i>Salvia miltiorrhiza</i> com actividade inibitória da AChE (Ren <i>et al.</i> , 2004).....	27
Figura 19. Estrutura química do Sugiol (27) (Córdova <i>et al.</i> , 2006).....	29
Figura 20. Luteolina (20) e luteolina 7-O- β -glucosido (30) , dois exemplos de flavonóides que cumprem os requisitos estruturais necessários à actividade antioxidante (López-Lázaro, 2009).....	36
Figura 21. Grupos estruturais envolvidos na captação de radicais pelos flavonóides (Soobrattee <i>et al.</i> , 2005).....	37

Índice de Esquemas

Esquema 1. Precursores das principais classes de terpenos (Seigler, 1998; Wink, 2010).	5
Esquema 2. Via metabólica dos esqueletos diterpénicos amplamente isolados de espécies <i>Plectranthus</i> (Rijo <i>et al.</i> , 2013).	7

I. INTRODUÇÃO

1.1. AS PLANTAS COMO FONTE DE OBTENÇÃO DE NOVOS FÁRMACOS

Desde a antiguidade, as plantas têm sido empregues para a prevenção e tratamento de uma série de doenças. Por todo o mundo, as plantas têm sido a base das práticas de medicina tradicional e continuam, hoje em dia, a ser importantes fontes de fármacos, especialmente nos países em desenvolvimento que ainda usam a medicina à base de plantas na sua saúde (Salim *et al.*, 2008).

As espécies da família Lamiaceae são consideradas importantes devido a seu uso na medicina popular, na culinária e como aromatizantes por todo o mundo. As espécies *Plectranthus* (Lamiaceae) contêm muitos compostos antioxidantes e apresentam diversas actividades, tais como anti-inflamatória, antimicrobiana e antifúngica (Abdel-Mogib *et al.*, 2002; Albuquerque *et al.*, 2007; Lukhoba *et al.*, 2006). Estas propriedades sugerem o *Plectranthus* como um promissor género para a descoberta de compostos medicinais (Figueiredo *et al.*, 2014).

É por isso que o isolamento e o conhecimento dos metabolitos secundários das espécies *Plectranthus* responsáveis pela actividade biológica é importante, não só para validar os usos populares dessas plantas, mas também para encontrar novas fontes de produtos com importantes potenciais económicos ou compostos que possam ser transformado em princípios activo.

As espécies *Plectranthus* são desde há muito tempo utilizadas na medicina tradicional. Deste modo, pretende-se compilar toda a informação recolhida na literatura sobre a espécie *P. ecklonii* pois esta planta esta a ser alvo de estudos recentes no grupo de investigação CBIOS. Este trabalho tem o objectivo de recolher e fazer uma revisão exhaustiva de todos os trabalhos publicados desta espécie. Esta dissertação lida com a identificação de todos os compostos isolados até agora a partir de extractos de *P. ecklonii* e as respectivas actividades biológicas.

1.2. GÉNERO *Plectranthus* L'Hérit

O género *Plectranthus* pertence à família de Angiospérmicas Lamiaceae (sub-família Nepetoideae, tribo Ocimeae) e engloba cerca de 350 espécies distribuídas principalmente por África Subtropical, Ásia e Austrália (Gaspar-Marques *et al.*, 2008; Narukawa *et al.*, 2001). O género *Plectranthus* foi descrito pela primeira vez pelo botânico

francês L'Heritier em 1788 (Lukhoba *et al.*, 2006) e, desde então, o número de espécies nele incluído tem vindo a aumentar.

Hoje em dia, os *Plectranthus* são conhecidos em todo o mundo devido aos seus usos hortícolas, visto que têm crescimento rápido, produzem lindas flores e são resistentes à maioria das pragas e doenças das plantas. As espécies *Plectranthus* ocorrem como ervas, subarbustos ou arbustos. Na Europa, nomeadamente em Portugal, várias espécies de *Plectranthus* são cultivadas como plantas ornamentais (Abdel-Mogib *et al.*, 2002).

Os potenciais usos medicinais e económicos do *Plectranthus* são de grande interesse pois há potenciais tratamentos para muitas condições escondidos neste género. O uso mais frequentemente citado das espécies de *Plectranthus* é pelas suas propriedades medicinais. Têm sido utilizadas para diferentes distúrbios digestivos, da pele e condições respiratórias, infeções genito-urinárias, infeções gerais e febre, dor e condições músculo-esqueléticas (Abdel-Mogib *et al.*, 2002; Lukhoba *et al.*, 2006; Narukawa *et al.*, 2001). Outras aplicações incluem repelentes de insectos (Pal *et al.*, 2011), feitiços e ervas culinárias (Lukhoba *et al.*, 2006).

Os principais componentes fitoquímicos do género *Plectranthus* são diterpenos, compostos fenólicos e óleos essenciais, estes últimos concedem ao género a sua natureza aromática (Abdel-Mogib *et al.*, 2002; Rice *et al.*, 2011).

1.3. *Plectranthus ecklonii* Benth.

A espécie *Plectranthus ecklonii* Benth. foi colhida pela primeira vez em 1813, pelo naturalista William Burchel no Cabo Oriental. Apresenta-se na forma de arbusto, perene ou anual, de crescimento rápido (1 a 3 m de altura), com folhas ovadas a elípticas, dispostas em pares, e floresce de Março a Maio com um pico em Abril (Van Jaarsveld, 2006).

É facilmente propagável por estaca ou sementes, sendo que as plantas jovens devem ser podadas após a floração ou, pelo menos, antes da Primavera. Existem três espécies cultiváveis disponíveis: a 'Medley Wood' de flores azuis, a 'Tommy' de flores brancas e a 'Erma', com flores, folhas e caules rosa (Van Jaarsveld, 2006).

O *P. ecklonii* é vulgarmente conhecido por *Ecklon spurflower* ou *Ecklon spoorsalie* (Van Jaarsveld, 2006) e está amplamente distribuído por África do Sul, Austrália, Nova Zelândia, México e Estados Unidos (Nyila *et al.*, 2009).



Figura 1. *Plectranthus ecklonii* 'Medley-Wood' (azul), *P. ecklonii* 'Tommy' (branco) e *P. ecklonii* 'Erma' (rosa) (Van Jaarsveld, 2006).

1.3.1. Usos tradicionais do *Plectranthus ecklonii* Benth.

O *Plectranthus ecklonii* Benth. é tradicionalmente usado na África do Sul para o tratamento de distúrbios gástricos, náuseas, vômitos e meningite, sintomas normalmente associados à infecção por listeriose. As folhas da planta são também usadas para problemas relacionados com a tuberculose, e no Zimbábwe, as partes aéreas são aplicadas para doenças de pele e problemas de hiperpigmentação (Lukhoba *et al.*, 2006).

A actividade do *P. ecklonii* contra a *Escherichia coli* observada por Nyila (2009) justifica o uso das espécies de *Plectranthus* na medicina tradicional para o tratamento de infecções gastrointestinais. Da mesma forma, o uso tradicional desta planta no caso de infecções de pele pode estar relacionado com a actividade antibacteriana de dois dos seus diterpenos, a parviflorona D **(1)** e a parviflorona F **(2)**, contra *Staphylococcus aureus* (Simões *et al.*, 2010).

II. METABOLITOS SECUNDÁRIOS DO GÉNERO *Plectranthus*

As plantas produzem inúmeros compostos de baixo e alto peso molecular, geralmente classificados como metabolitos primários e secundários ou produtos naturais. A importância dos metabolitos secundários provenientes das plantas na medicina, agricultura e indústrias tem atraído inúmeros cientistas a aventurarem-se na sua síntese química, biossíntese e bioactividade.

Os metabolitos secundários das plantas podem dividir-se em três grandes categorias, (a) terpenos ou terpenóides, (b) alcalóides e (c) compostos fenólicos (Devappa *et al.*, 2011).

Os principais componentes fitoquímicos do género *Plectranthus* são diterpenos, óleos essenciais e compostos fenólicos (Abdel-Mogib *et al.*, 2002). Os diterpenos abietanos das espécies *Plectranthus* são compostos antimicrobianos e citotóxicos específicos (Teixeira *et al.*, 1997; Gaspar-Marques, 2006).

O principal composto do extracto polar da planta *Plectranthus* é o ácido rosmarínico (**3**), um composto comum na família Lamiaceae. O ácido rosmarínico (**3**) em conjunto com dois outros ésteres de ácido cafeico, a nepetoidina A (**4**) e a nepetoidina B (**5**), são utilizados como marcadores quimiotaxonómicos da subfamília Nepetoideae (Grayer *et al.*, 2003; Kubínová *et al.*, 2013a).

2.1. TERPENOS E BIOSSÍNTESE

Os terpenos constituem sem dúvida a maior, mais distribuída e, do ponto de vista estrutural, a mais diversificada classe de metabolitos secundários (Devappa *et al.*, 2011). A sua importância, nomeadamente a nível terapêutico, justifica os inúmeros esforços realizados ao longo das últimas décadas no sentido da elucidação da sua biossíntese (Eisenreich *et al.*, 2004).

Os terpenos resultam da união de várias unidades de isopreno (**6**), sendo agrupados consoante o número de unidades incluídas nos esqueletos hidrocarbonados das suas moléculas.

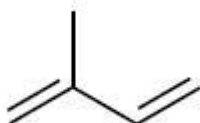
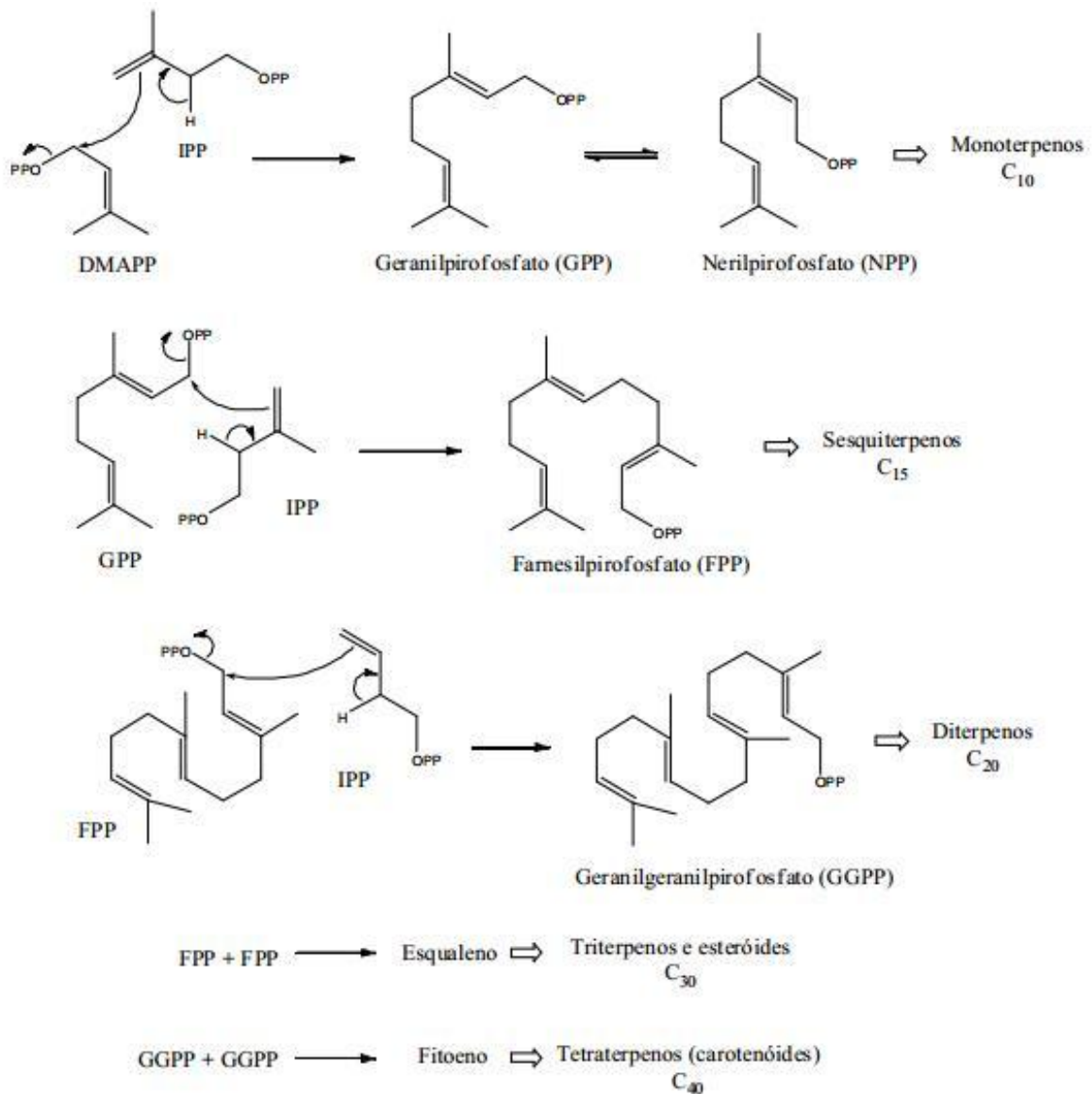


Figura 2. Estrutura do isopreno (**6**) (2-metil-1,3-butadieno) (Dewick, 2002).

As unidades bioquímicas a partir das quais são sintetizados todos os terpenos são o isopentenil-pirofosfato (IPP) e o seu isômero dimetilalil-pirofosfato (DMAPP) (Dewick, 2002). O Esquema 1 representa a biossíntese dos precursores dos principais grupos de terpenos.



Esquema 1. Precursores das principais classes de terpenos (Seigler, 1998; Wink, 2010).

2.1.1. DITERPENOS

Os diterpenos são o grupo mais estudado de compostos secundários no género *Plectranthus*, sendo a maioria abietanos que contêm anéis fenólicos ou anéis de quinona, além de alguns labdanos, *ent*-kauranos¹ e *seco*-kauranos² (Abdel-Mogib *et al.*, 2002).

O interesse no isolamento de diterpenóides continua a crescer devido ao seu amplo espectro de actividades biológicas (Hanson, 2005). Por exemplo, os abietanos diterpénicos têm atraído interesse devido à sua actividade antibacteriana (Figueiredo *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 1997), antioxidante (Rijo *et al.*, 2009) bem como pelos seus efeitos inibitórios sobre diferentes linhas de células tumorais humanas (Wellsow *et al.*, 2006). Alguns dos diterpenos bioactivos mais conhecidas são o taxol **(7)** (com propriedades anti-tumorais) e a forskolina **(8)**, isolada a partir do *Plectranthus barbatus*, um dos *Plectranthus* cujos compostos têm sido mais estudados (Lukhoba *et al.*, 2006).

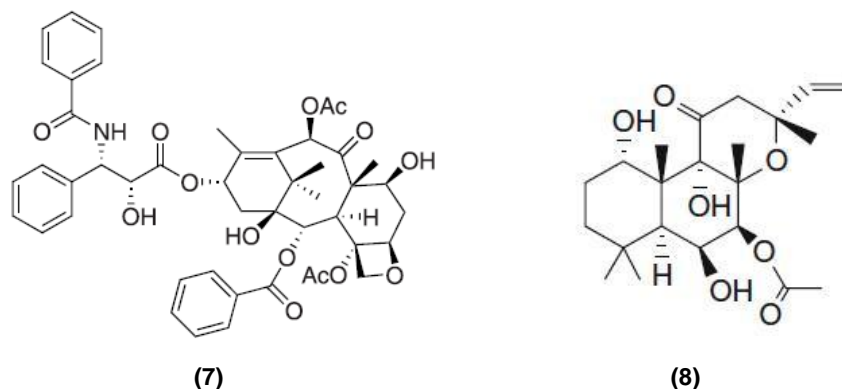


Figura 3. Diterpenos taxol **(7)** e forskolina **(8)** (Salim *et al.*, 2008; Lanzotti, 2013).

2.1.1.1. Diversidade química dos Diterpenos

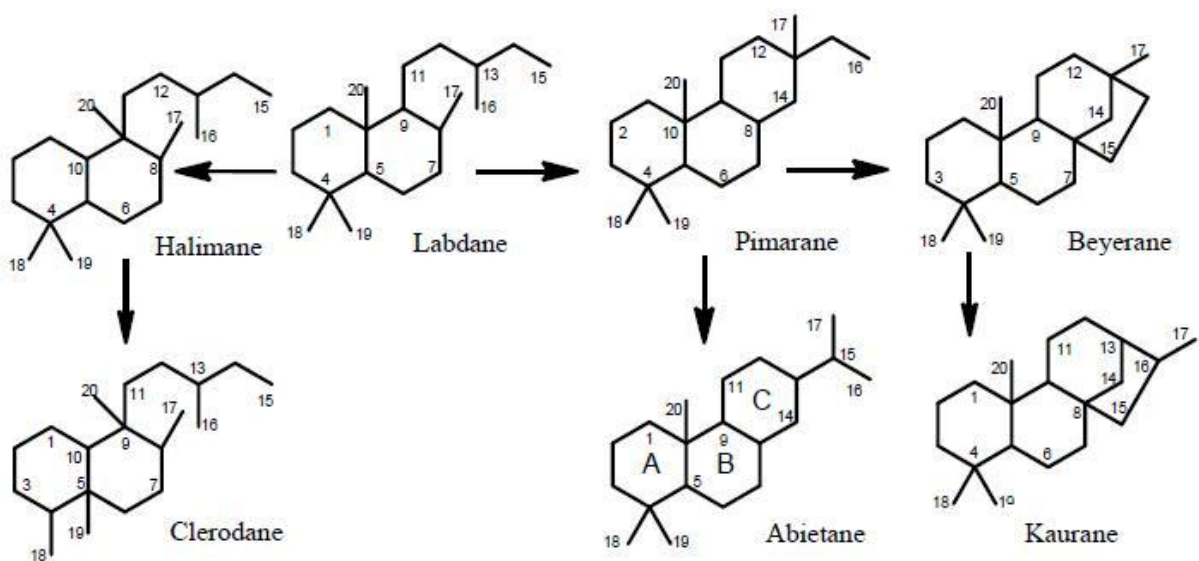
Os diterpenos são uma classe heterogénea de compostos naturais com base num esqueleto com 20 átomos de carbono (C₂₀). Encontram-se amplamente distribuídos na natureza, tanto em organismos terrestres como marinhos. Resultam da condensação de quatro unidades de isopreno (C₅H₈), derivadas da via do mevalonato (via do ácido mevalónico) ou da via do 5-fosfato 1-deoxi-D-xilulose (DXP, via independente do mevalonato). Evidências sugerem ser esta última via a principal responsável pela biossíntese dos diterpenos nas plantas (Lanzotti, 2013).

¹ Diterpenos tetracíclicos da série *enantio*. O prefixo *ent*- indica a estereoquímica do esqueleto.

² Prefixo *seco*- indica transformação do abietano inicial por abertura do anel.

Relativamente ao tipo de esqueleto hidrocarbonado, os diterpenos podem ser acíclicos ou cíclicos. A maioria pertence ao grupo dos cíclicos, sendo exactamente a diversidade na ciclização do esqueleto hidrocarbonado, aliada à diversidade dos grupos funcionais com oxigénio (p.e., hidroxilos, carbonilos, epóxidos, quinonas, ácidos e derivados ácidos), o que define as suas múltiplas propriedades biológicas (Rijo *et al.*, 2013). O Esquema 2 apresenta um diagrama da biossíntese dos diterpenos, classificados de acordo com o esqueleto encontrado nas espécies de *Plectranthus*.

Devido aos seus pontos de ebulição elevados, os diterpenos não são consideradas óleos essenciais mas sim resinas, o material remanescente após a destilação a vapor de um extracto vegetal (Wang *et al.*, 2002).



Esquema 2. Via metabólica dos esqueletos diterpénicos amplamente isolados de espécies *Plectranthus* (Rijo *et al.*, 2013).

2.1.1.2. Diterpenos abietânicos

Os abietanos são o esqueleto com maior ocorrência e difusão na subfamília Lamiaceae (Alvarenga *et al.*, 2001). A seguir ao género *Salvia*, o género mais rico em diterpenos abietânicos é o *Plectranthus*. Os abietanos presentes no género *Plectranthus* são maioritariamente roileanonas, espirocoleonas e quinonas, e diversos estudos apresentam estes compostos como possuidores de actividade antimicrobiana (Dellar *et al.*, 1996; Teixeira *et al.*, 1997; Wellsow *et al.*, 2006).

Van Zyl *et al.* (2007) isolaram sete abietanos diterpénicos, incluindo as parvifloronas D (**1**) e F (**2**), a partir das folhas de cinco espécies diferentes de *Plectranthus*. As

parvifloronas são diterpenos naturais amplamente distribuídos por diversas espécies de *Plectranthus* (Simões *et al.*, 2010).

Os pigmentos **(1)** e **(2)** foram isolados pela primeira vez a partir de um extracto etéreo de *Plectranthus parviflorus* (Rüedi & Eugster, 1978). Desde então, a Parviflorona D **(1)**, 11-hidroxi-2-(4-hidroxibenzoil)-5,7,9(11),13-abietatetraen-12-ona, foi isolada a partir do *P. strigosus* Benth. (Gaspar-Marques *et al.*, 2008) e do *P. ecklonii* Benth. e reportada a sua actividade antibacteriana, inclusivé contra estirpes metilicina- e vancomicina-resistentes (Simões *et al.*, 2010). A parviflorona F **(2)**, 11-hidroxi-2 α -(3,4-dihidroxibenzoiloxi)- abieta-5,7,9(11),13-tetraene-12-ona, foi também isolada do *P. ecklonii* e do *Plectranthus nummularius* Briq. (Narukawa *et al.*, 2001), assim como a Parviflorona E **(9)**, 11-hidroxi-19-(3,4-dihidroxibenzoiloxi)-abieta-5,7,9(11),13-tetraene-12-ona (Figueiredo *et al.*, 2014).

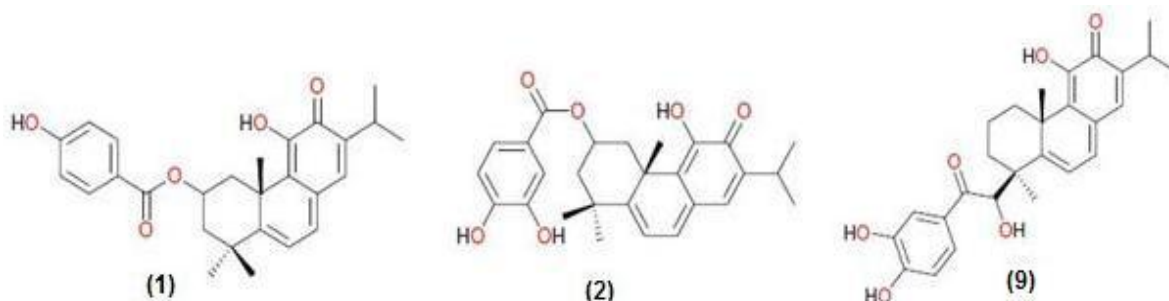


Figura 4. Parvifloronas D **(1)**, F **(2)** e E **(9)** (Onguéné *et al.*, 2013).

2.1.2. TRITERPENOS E ESTERÓIS

Os triterpenos e os esteróis são dois grupos elaborados geneticamente a partir do mesmo precursor, o esqualeno (ver Esquema 1).

Os triterpenos, de fórmula molecular $C_{30}H_{48}$, pertencem ao grupo dos terpenos, podendo apresentar esqueleto de carbono acíclico ou conter estruturas mono-, bi-, tri-, tetra- e pentacíclicas (Dewick, 2002; Xu *et al.*, 2004).

Em termos de actividade biológica, presume-se que as estruturas triterpénicas mais importantes são aquelas que possuem os esqueletos de carbono do damarano e eufano (triterpenos tetracíclicos) e do oleanano, ursano e lupano (triterpenos pentacíclicos) (Dzubak *et al.*, 2006). A estrutura geral dos triterpenos pentacíclicos **(10)** está representada na Figura 5.

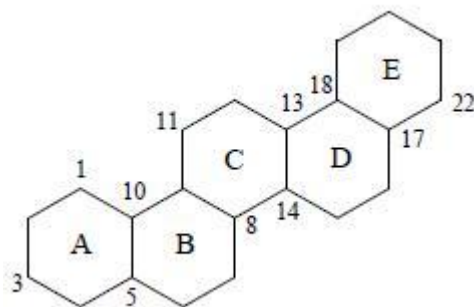


Figura 5. Estrutura geral dos triterpenos pentacíclicos **(10)** (Xu *et al.*, 2004).

Os esteróis vegetais são ácidos gordos contidos nas plantas. O interesse nutricional nos esteróis deriva da semelhança estrutural que têm para com o colesterol **(11)**, e a sua capacidade para diminuir os níveis plasmáticos de colesterol e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Ao contrário dos esteróis, os triterpenos não ocorrem no reino animal (Gabay *et al.*, 2010).

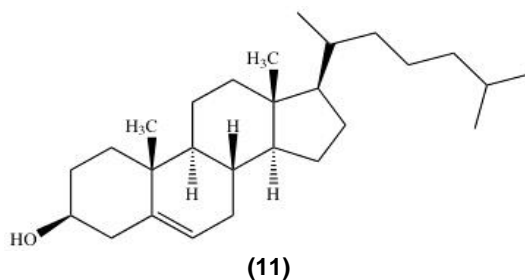


Figura 6. Estrutura química do colesterol **(11)**

[<http://www.chem.ucla.edu/harding/IGOC/C/cholesterol.html>, 19-11-2014]

No género *Plectranthus* foram isolados sobretudo, triterpenos vulgares na natureza, como o ácido ursólico **(12)**, o ácido oleanólico **(13)**, a betulina e o ácido betulínico. Os ácidos triterpénicos exibem actividades biológicas e farmacológicas importantes, nomeadamente anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, citotóxica, e efeitos cardiovasculares (Li *et al.*, 2002; Odjakova *et al.*, 2012).

Os ácidos oleanólico **(13)** e ursólico **(12)** são ácidos triterpénicos isoméricos, que apenas diferem na posição do grupo metilo em C29, e que surgem sempre em simultâneo na mesma planta (Xu *et al.*, 2012).

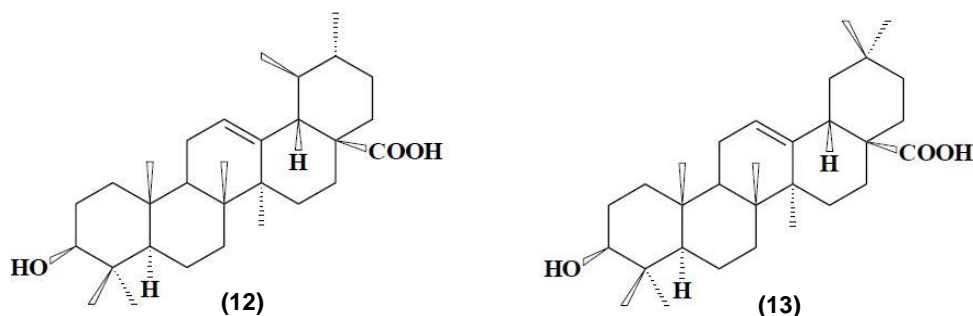


Figura 7. Estruturas químicas do ácido ursólico (12) e do ácido oleanólico (13) (Furtado *et al.*, 2008).

Em 1971, Misra *et al.*, relataram o isolamento dos triterpenos ácido ursólico (12), ácido oleanólico (13) e betulina, em conjunto com o β -sitosterol (14) e o hexacosanol. Anos mais tarde, os compostos (12), (13) e (14) também foram isolados a partir das raízes do *Plectranthus straitus* Benth. (Tandon *et al.* 1990).

Mais recentemente, misturas de ácido ursólico (12) e oleanólico (13) foram isoladas do extracto acetónico do *P. ecklonii*, em conjunto com uma mistura dos esteróis β -sitosterol (14) e estigmasterol (15) (Simões *et al.*, 2010). Syamasundar *et al.* (2012) também relataram o isolamento do triterpeno (13) e dos dois esteróis (14 e 15) a partir do extracto metanólico do *Plectranthus bishopianus* Benth.

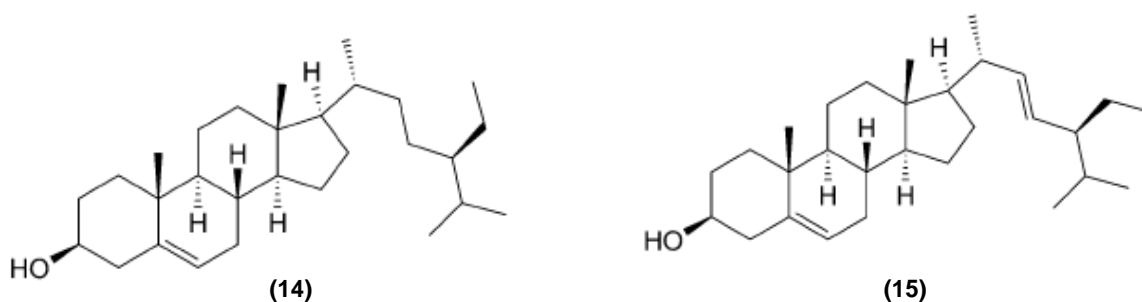


Figura 8. β -sitoesterol (14) e estigmasta-5,22(E)-dien-3 β -ol (15) (Syamasundar *et al.*, 2012).

2.2. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas que desempenham um papel importante na resistência a doenças, protecção contra pragas e disseminação de espécies. Dependendo da estrutura química existem dez classes principais e de entre estas, os flavonóides e os ácidos fenólicos (principalmente os ácidos

hidroxicinâmicos) são os compostos mais abundantes encontrados em extractos vegetais (Ramu *et al.*, 2012).

O interesse nestes compostos prende-se com a sua actividade antioxidante, que representa também um possível mecanismo explicativo para muitos outros efeitos destes constituintes (anti-aterosclerótico, anti-inflamatório e antitumoral) (Aprotosoaie *et al.*, 2013). A propriedade mais recentemente identificada nos polifenóis é o seu efeito nas complicações a longo prazo da diabetes, incluindo retinopatia, nefropatia e neuropatia (Bahadoran *et al.*, 2013).

Os principais compostos fenólicos identificados nos extractos de *Salvia* e *Plectranthus* são os ácidos clorogénico (**16**), rosmarínico (**3**), carnósico e salvianólico. Destes, os ácidos rosmarínico (**3**) e clorogénico (**16**) são os principais constituintes e apresentam forte poder antioxidante (Ramu *et al.*, 2012).

2.2.1. Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos possuem um ou mais anéis aromáticos com pelo menos um grupo hidroxilo. Em função do número de anéis fenólicos que possuam e dos elementos estruturais que se ligam a esses anéis e entre eles, subdividem-se em ácidos hidroxibenzóicos (**17a**), com sete átomos de carbono (C6-C1), e ácidos hidroxicinâmicos (**17b**), compostos aromáticos com nove átomos de carbono (C6-C3) (Ângelo & Jorge, 2007).



Figura 9. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (**17a**) e hidroxicinâmicos (**17b**) (Ângelo & Jorge, 2007).

Os ácidos hidroxicinâmicos, bastante mais comuns que os ácidos hidroxibenzóicos, raramente se encontram na forma livre, mas ocorrem frequentemente sob a forma de ésteres glicosilados (Sandhar *et al.*, 2011).

2.2.1.1. Ácido cafeico e derivados do tipo éster

Entre os ácidos cinâmicos mais abundantes encontra-se o ácido cafeico **(18)** (ácido 3,4-dihidroxicinâmico), descrito como tendo uma ampla variedade de actividades biológicas, incluindo antioxidante, antitrombótica, anti-hipertensiva, antifibrótica, antiviral e propriedades antitumorais (Prasad *et al.*, 2011).

Da combinação entre o ácido cafeico **(18)** e o ácido quínico resulta o ácido 5-O-cafeoilquínico ou ácido clorogénico **(16)**. Já o ácido rosmarínico **(3)** é um éster do ácido cafeico com o ácido 3,4-dihidroxifenil láctico (DHFL) (Petersen, 2013) com elevado número de actividades biológicas, nomeadamente antitumoral, antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidante (Bhatt *et al.*, 2013).

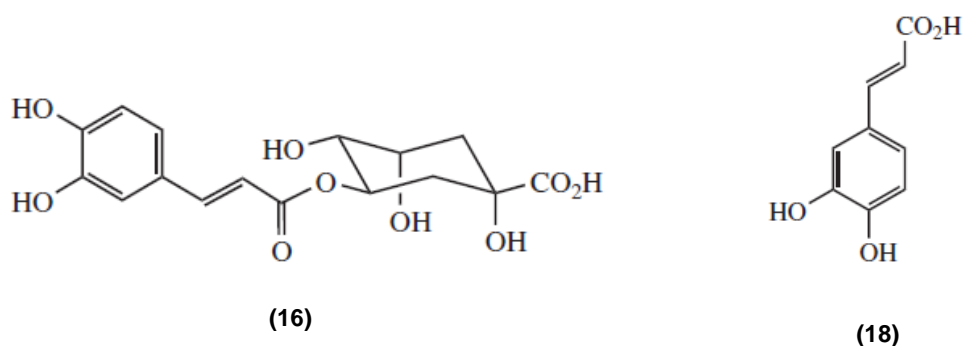


Figura 10. Ácido clorogénico **(16)** e ácido cafeico **(18)** (Dewick, 2009).

Figueiredo *et al.* (2010) apontaram a presença do ácido rosmarínico **(3)** no extracto aquoso do *P. ecklonii* como sendo o responsável pela actividade antibacteriana contra *Streptococcus* spp. e pela inibição da enzima glicosiltransferase (GTF). Falé *et al.* (2009) também relacionaram a presença deste composto com os efeitos observados, inibição da acetilcolinesterase (AChE) e actividade antioxidante.

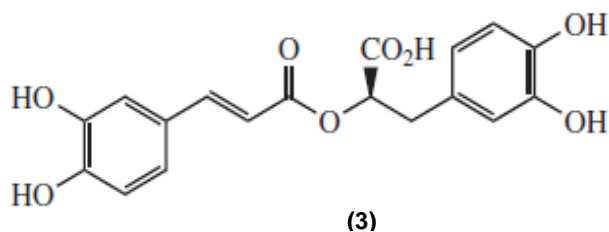


Figura 11. Estrutura do ácido rosmarínico **(3)** (Dewick, 2009).

Enquanto o ácido cafeico (**18**) e os seus derivados são de ocorrência generalizada na família Labiatae, o ácido rosmarínico (**3**) é restrito à subfamília Nepetoideae (Abdel-Mogib *et al.*, 2002). Por esta razão, o ácido rosmarínico (**3**) e dois outros ésteres de ácido cafeico, conhecidos como nepetoidina A (**4**) e nepetoidina B (**5**) (Grayer *et al.*, 2003), são utilizados como marcadores quimiotaxonómicos da subfamília Nepetoideae.

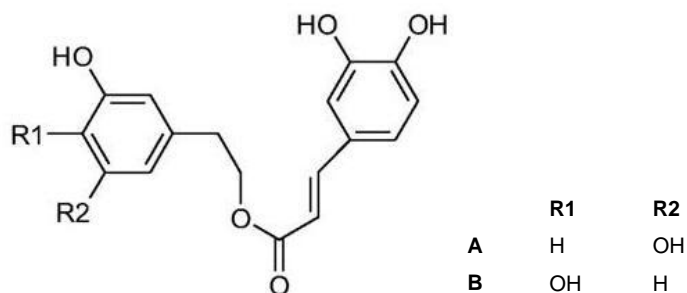


Figura 12. Nepetoidina A (**4**) e Nepetoidina B (**5**) (Kubínová *et al.*, 2013a).

2.2.2. Flavonóides

Os flavonóides são compostos aromáticos de baixo peso molecular caracterizados por um núcleo flavânico e um esqueleto carbonado com configuração C6-C3-C6. A estrutura básica dos flavonóides consiste em dois anéis de benzeno (A e B) ligados por um anel pirano que contém oxigénio (anel C). A numeração individual do esqueleto flavonóide está representada na Figura 13 (Martens & Mithöfer, 2005).

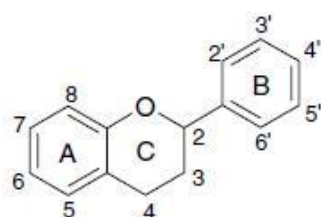


Figura 13. Estrutura e numeração padrão dos flavonóides (Martens & Mithöfer, 2005).

As variações nas configurações de substituição do anel C resultam nas diversas subclasses dos flavonóides: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis (ou catequinas) e antocianidinas.

Os flavonóides podem ocorrer na sua forma livre (agliconas), ligados a açúcares (glicosidos/heterosidos) ou ainda como derivados metilados. Nas plantas, estão muitas vezes presentes como O-glicosidos ou C-glicosidos. Os O-glicosidos possuem o substituinte

açúcar ligado a um grupo hidroxilo (-OH) da aglicona, geralmente na posição C3 ou C7, enquanto os C-glicosídeos possuem os grupos de açúcar directamente ligados a um carbono da aglicona, geralmente C6 ou C8 (Sandhar *et al.*, 2011).

Relatos de estudos apontam os flavonóides como detentores de diversas actividades biológicas, incluindo anti-inflamatória, anti-bacteriana, citotóxica antitumoral, efeitos no tratamento de doenças neurodegenerativas e acção vasodilatadora. São ainda conhecidos por inibirem a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária e a actividade enzimática das enzimas ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) (Asif & Khodadadi, 2013).

2.2.2.1. Flavonas e Flavanonas: estrutura e bioactividade

As flavonas diferem das flavanonas pela presença de uma ligação dupla entre C2 e C3 no heterociclo do esqueleto flavanóide (Figura 14). O anel B está ligado a C2 e normalmente não existem substituintes em C3. As flavonas ocorrem principalmente como 7-O-glicosídeos, embora a substituição possa ser encontrada em qualquer outra posição hidroxilada (Martens & Mithöfer, 2005).

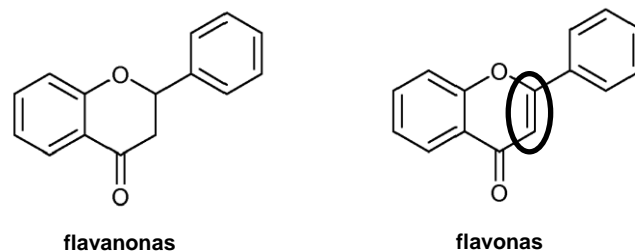


Figura 14. A ligação dupla entre C2 e C3 permite distinguir flavonas de flavanona (Balasundram *et al.*, 2006).

As duas flavonas mais comuns, encontradas em várias espécies de plantas, são a apigenina **(19)** e a luteolina **(20)**. A apigenina **(19)** (4',5,7-trihidroxi-flavona) tem ganho particular interesse nos últimos anos como um agente benéfico e de promoção da saúde, devido à sua baixa toxicidade intrínseca. As plantas ricas em luteolina **(20)** (3',4',5,7-tetrahidroxi-flavona) têm sido usadas na medicina tradicional chinesa para o tratamento de várias doenças tais como a hipertensão, doenças inflamatórias e cancro (Lin *et al.*, 2008).

A vitexina **(21)** e a isovitexina **(22)**, derivados C-glicosilados naturais da apigenina **(19)**, têm revelado possuir potentes actividades anti-diabéticas, anti-Alzheimer (anti-AD) e anti-inflamatórias (Choi *et al.*, 2014). Os extractos de plantas que contêm vitexina **(21)**

(apigenina-8-C- β -D-glucopiranosido) reportaram actividade anti-inflamatória e antioxidante (Borghi *et al.*, 2013).

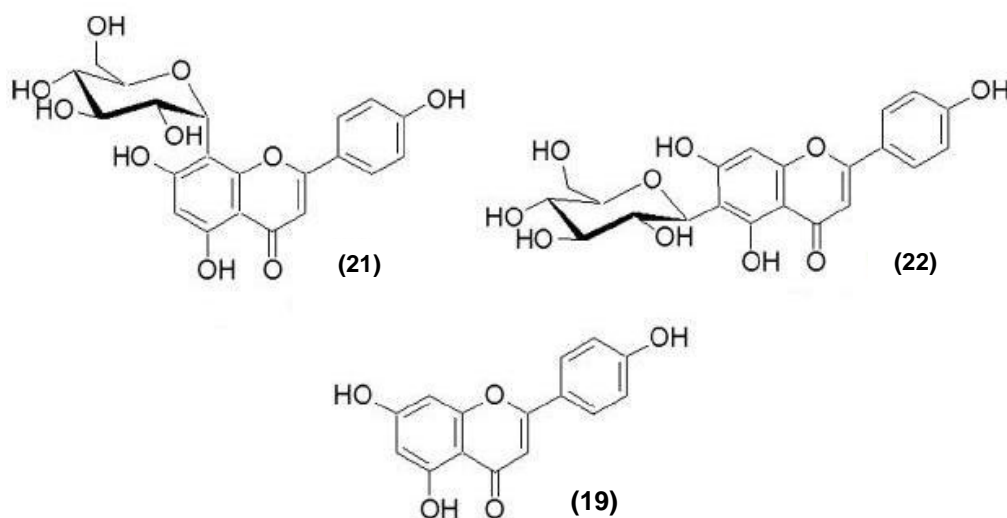


Figura 15. Estrutura da apigenina **(19)** e dos seus derivados C-glicosilados **(21)** e **(22)** (Choi *et al.*, 2014).

Todas estas flavonas foram isoladas das folhas do *Plectranthus ecklonii* (Hawas *et al.*, 2008), assim como a salvigenina **(23)**, a cirsimiratina **(24)** e a flavanona correspondente, 2(S)-4',5-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavanona **(25)** (Grayer *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 1980). Os flavonóides com uma substituição do tipo 5-hidroxi-6,7-dimetoxi- no anel A, como por exemplo as flavonas salvigenina **(23)**, cirsimaritina **(24)** e cirsilol **(26)**, são considerados típicos da família Labiateae (Gaspar-Marques, 2006).

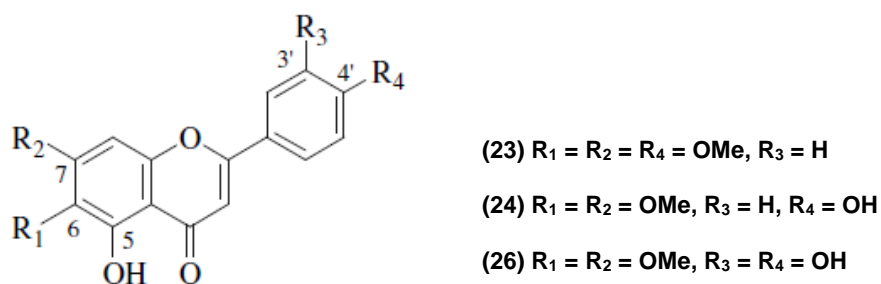


Figura 16. Estruturas químicas das flavonas 5-Hidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona **(23)**, escutelareina 6,7-dimetil éter **(24)** e 3',4',5-Trihidroxi-6,7-dimetoxi-flavona **(26)** (Grayer *et al.*, 2010).

III. COMPOSTOS ISOLADOS DE *Plectranthus ecklonii* Benth. E A SUA BIOACTIVIDADE

A Tabela 1 enumera os vinte e oito compostos isolados até à data no *P. ecklonii* Benth., os respectivos extractos e as diferentes bioactividades avaliadas. Os metabolitos secundários isolados pertencem maioritariamente às classes dos terpenos e dos compostos fenólicos, tal como verificado nas diversas espécies de *Plectranthus* estudadas ao longo dos anos.

Tabela 1. Compostos isolados de *Plectranthus ecklonii* Benth.

Compostos isolados	Estrutura	Isolamento / Identificação	Bioatividade	Solvente extractor / Parta da planta	Ref.
TERPENOS					
Parviflorona D (1)	11-hidroxi-2 α -(4-hidroxibenzoiloxi)-abieta-5,7,9(11),13-tetraen-12-ona	MS + RMN	antibacteriana	Diclorometano:EtAc	Gurlal, 2005
		RMN	nr	Diclorometano / p.a.	Van Zyl <i>et al.</i> , 2008
				EtAc / p.a.	Nyila <i>et al.</i> , 2009; Nyila, 2010
		MS + RMN	antibacteriana	Acetona / P.i.	Simões <i>et al.</i> , 2010
Parviflorona F (2)	11-hidroxi-2 α -(3,4-dihidroxibenzoiloxi)abieta-5,7,9(11),13-tetraen-12-ona	RMN	nr	Éter / p.a.	Uchida <i>et al.</i> , 1980
			antiplasmódica	Diclorometano / p.a.	Van Zyl <i>et al.</i> , 2007; Van Zyl <i>et al.</i> , 2008
			nr	EtAc / p.a.	Nyila <i>et al.</i> , 2009; Nyila, 2010
Parviflorona E (9)	11-hidroxi- 19-(3,4-dihidroxibenzoiloxi)-abieta-5,7,9 (1 l), 13-tetraen-12-ona		antiplasmódica	p.a.	Van Zyl <i>et al.</i> , 2007
		HPLC-DAD / MS	anticariogénese	Metanol / p.a.	Figueiredo <i>et al.</i> , 2014
Sugiol (27)	12-hidroxiabieta-8,11,13-trien-7-ona	MS + RMN	antibacteriana	Acetona / P.i.	Simões <i>et al.</i> , 2010
Mix de ác. Ursólico (12) e ác. Oleanólico (13)	Ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-óico (12)	MS + RMN	antibacteriana	Acetona / P.i.	Simões <i>et al.</i> , 2010
	Ácido 3 β -hidroxi-olea-12-en-28-óico (13)				
Mix de β -sitosterol (14) e estigmasterol (15)	3 β -estigmasta-5-en-3-ol (14)				
	estigmasta-5,22(E)-dien-3 β -ol (15)				

nr – não referido; p.a. – partes aéreas (folhas); P.i. – Planta inteira

Tabela 1 (continuação)

Compostos isolados	Estrutura	Identificação / Isolamento	Bioactividade	Solvente extractor / Parte da planta	Ref.
COMPOSTOS FENÓLICOS					
Ácido Cafeico (18)	Ácido 3,4-dihidroxicinâmico	RMN	antimicrobiana	Metanol:Água / p.a.	Hawas <i>et al.</i> , 2008
		HPLC-DAD	anti-AChE e antioxidante	Aquoso (decoç)	Gomes <i>et al.</i> , 2012
Ácido Rosmarínico (3)	Ácido 3,4-dihidroxicinâmico (R)-1-carboxi-2-(3,4-dihidroxifenil)etil éster		antibacteriana	Aquoso (decoç) / p.a.	Figueiredo <i>et al.</i> , 2010
		HPLC-DAD	anti-AChE e antioxidante	Aquoso (decoç)	Gomes <i>et al.</i> , 2012
		HPLC-DAD / RMN	anti-cariogénese	Metanol / p.a.	Figueiredo <i>et al.</i> , 2014
Nepetoidina A (4)	(Z,E)-[2-(3,5-dihidroxifenil)etenil] 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoato	HPLC-DAD / RMN	antifúngica e antioxidante	Éter dietílico / p.a.	Grayer <i>et al.</i> , 2003
Nepetoidina B (5)	(Z,E)-[2-(3,4-dihidroxifenil)etenil] 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-propenoato				
Ácido Clorogénico (16)	Ácido 5-cafeoilquinico	HPLC-DAD	anti-AChE e antioxidante	Aquoso (decoç)	Gomes <i>et al.</i> , 2012
Apigenina (19)	4',5,7-trihidroxiflavona	RMN	antimicrobiana	Metanol:Água / p.a.	Hawas <i>et al.</i> , 2008
		LC-MS	nr	Éter dietílico / p.a.	Grayer <i>et al.</i> , 2010
Apigenina 7-O- β -glucosido (28)	(28)	RMN	antimicrobiana	Metanol:Água / p.a.	Hawas <i>et al.</i> , 2008
Apigenina 4',6-dimetoxi-7-O- β -glucosido (29)	(29)				
Vitexina (21)	Apigenina-8-C-glucosido				
Isovitexina (22)	Apigenina-6-C-glucosido				

p.a. – partes aéreas (folhas); decoç – decocção; nr – não referido

Tabela 1 (continuação)

Compostos isolados	Estrutura	Identificação / Isolamento	Bioatividade	Solvente extractor / Parte da planta	Ref.
COMPOSTOS FENÓLICOS (cont.)					
Luteolina (20)	3',4',5,7-tetrahidroxiflavona	RMN	antimicrobiana	Metanol:Água / p.a.	Hawas <i>et al.</i> , 2008
Cinarosida	Luteolin 7-O- β -glucosido (30)				
Genkwanina (31)	4',5-dihidroxi-7-metoxiflavona	HPLC / LC-MS	nr	Éter dietílico / p.a.	Grayer <i>et al.</i> , 2010
Ladaneina (32)	Escutelareina 7,4'-dimetil éter				
Salvigenina (23)	5-Hidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona				
Cirsiliol (26)	3',4',5-Trihidroxi-6,7-dimetoxi-flavona				
Cirsimaritina (24)	Escutelareina 6,7-dimetil éter	RMN	nr	Éter / p.a.	Uchida <i>et al.</i> , 1980
		HPLC / LC-MS		Éter dietílico / p.a.	Grayer <i>et al.</i> , 2010
(25)	2 (S)-4',5-dihidroxi-6, 7-dimetoxiflavanona (25)	RMN	nr	Éter / p.a.	Uchida <i>et al.</i> , 1980
OUTROS COMPOSTOS					
Ecklonoquinona A (33)		RMN	nr	Éter / p.a.	Uchida <i>et al.</i> , 1980
Ecklonoquinona B (34)					

p.a. - partes aéreas (folhas); nr – não referido

3.1. COMPOSTOS ISOLADOS DE *Plectranthus ecklonii* Benth.

Uchida *et al.* (1980) foram os primeiros a reportar o isolamento e identificação de compostos de *P. ecklonii*. Na altura detectaram a presença do abietano parviflorona F (**2**) e das ecklonoquinonas A (**32**) e B (**33**). Decorridos mais de 30 anos, a composição desta espécie ainda não é completamente clara.

No total foram identificados quatro diterpenos abietânicos (**1**, **2**, **9** e **27**), dois triterpenos (**12** e **13**) e dois esteróis (**14** e **15**), sendo a parviflorona D (**1**) o composto isolado em maior quantidade (Simões *et al.*, 2010). Os extractos mais usados para o isolamento destes compostos são os do tipo acetónico e metanólico.

De uma maneira geral, os diterpenos são compostos com média a baixa polaridade, embora muitas vezes ocorram nas plantas na forma glicosilada, e nesse caso são substâncias polares. Para a sua extracção são normalmente usados solventes de polaridade média como o diclorometano, o acetato de etilo (EtAC) e a acetona; ou solventes fortemente polares, por exemplo, metanol, misturas de álcoois e água, ou mesmo água pura (Waksmundzka-Hajnos & Sherma, 2011).

A partir do extracto de acetato de etilo de plantas do *P. ecklonii* foram isolados dois abietanos, a parviflorona D (**1**) e a parviflorona F (**2**) (Nyila *et al.*, 2009). Van Zyl *et al.* (2008) também isolaram estes dois abietanos a partir de um extracto de diclorometano de *P. ecklonii*. Para a detecção da parviflorona E (**9**) foi necessário um solvente polar mais forte, neste caso, o metanol (Figueiredo *et al.*, 2014).

Num outro estudo, a parviflorona D (**1**) foi isolada a partir de um extracto acetónico do *P. ecklonii* em conjunto com o diterpeno sugiol (**27**) e misturas de ácido ursólico (**12**) e ácido oleanólico (**13**), e de β -sitosterol (**14**) e estigmasterol (**15**) (Simões *et al.*, 2010). Entretanto, os compostos (**13**), (**14**) e (**15**) foram também isolados no *Plectranthus bishopianus* Benth. mas a partir de um extracto metanólico (Syamasundar *et al.*, 2012).

Os ácidos hidrocinâmicos são outros dos compostos característicos desta planta. Além do ácido cafeico (**18**) foram também isolados quatro seus derivados (**3**, **4**, **5** e **16**), sendo o ácido rosmarínico (**3**) o principal composto dos extractos aquosos do *P. ecklonii*.

O isolamento dos ácidos hidrocinâmicos está principalmente descrito na literatura em extractos aquosos, verificando-se no caso do *P. ecklonii*, uma tentativa dos cientistas para testar outros extractos, nomeadamente extractos hidroalcoólicos. Embora, tradicionalmente, os extractos vegetais sejam preparados com água (por exemplo, infusões, decocções e cataplasmas) (Rabe & Staden, 1997), existem relatos de estudos em que os

extractos metanólicos revelaram maior conteúdo em compostos fenólicos que os aquosos (Krishnaiah *et al.*, 2011).

Os estudos fitoquímicos que têm sido relatados com o *P. ecklonii* também incluem o isolamento de duas *orto*-quinonas isoméricas, as ecklonoquinonas A (**33**) e B (**34**) (Uchida *et al.*, 1980), doze flavonas e uma flavanona (**25**). Não foi encontrada na literatura referência a quaisquer bioactividades exercidas pelas ecklonoquinonas A nem B, pelo que não serão alvo de análise neste capítulo.

Um estudo com o extracto hidroalcoólico de folhas de *P. ecklonii* exibiu diversos graus de actividade antimicrobiana e resultou na identificação das flavonas: vitexina (**21**), isovitexina (**22**), apigenina 7-*O*- β -glucosido (**28**), apigenina 4',6-dimetoxi-7-*O*- β -glucosido (**29**), luteolina 7-*O*- β -glucosido (**30**), apigenina (**19**) e luteolina (**20**) (Hawas *et al.*, 2008). Desde então, foram ainda isoladas a partir do *P. ecklonii* as flavonas cirsimarina (**24**), ladaneína (**32**) e salvigenina (**23**) (Grayer *et al.*, 2010).

À excepção de um estudo em que foi usada a planta completa (Simões *et al.*, 2010), todos os outros utilizaram as partes aéreas (folhas), possivelmente para mimetizar mais fielmente o uso tradicional desta planta. Além de que a colheita de folhas para fins medicinais é mais sustentável que a de outras partes da planta, como raízes e caules, cuja colheita excessiva poderia até ameaçar a sobrevivência da planta (Zschocke *et al.*, 2000).

A bioactividade mais estudada nos compostos isolados de *P. ecklonii* foi a antimicrobiana, tendo sido testados diferentes tipos de microorganismos. Os compostos revelaram variados graus de actividade contra bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*), e fungos como o *Aspergillus niger* e a *Candida albicans*. De um modo geral, os compostos exercem maior actividade antibacteriana nas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria* e *Streptococcus*).

Embora os estudos realizados com esta espécie tenham incidido sobretudo na acção antimicrobiana dos seus constituintes, todos os compostos já demonstraram possuir outras bioactividades, nomeadamente antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. Por esse motivo, neste capítulo, serão enunciadas algumas das propriedades atribuídas aos diferentes constituintes do *P. ecklonii*, de modo a tentar justificar e perceber, não apenas as aplicações tradicionais desta planta mas também futuras aplicações.

3.2. BIOACTIVIDADE DOS DITERPENOS ISOLADOS DE *P. ecklonii* Benth.

3.2.1. Actividade antimicrobiana

As folhas dos membros da família Lamiaceae são conhecidas por conterem terpenóides com actividades antifúngicas, antibacterianas e repelente de insectos (Cole, 1994). Os extractos obtidos a partir de folhas de algumas espécies de *Plectranthus* da África do Sul revelaram actividade antibacteriana (Rabe & Staden, 1997). Os diterpenos abietânicos isolados de *Plectranthus grandidentatus* e de *Plectranthus hereroensis* demonstraram ser activos contra *Enterococcus faecalis* vancomicina-resistentes (VRE) e *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes (MRSA) (Gibbons, 2004; Gaspar-Marques *et al.* 2006); e os de *Plectranthus elegans* inibiram a germinação do fungo *Cladosporium cucumerinum* e o crescimento de *Bacillus subtilis* (Dellar *et al.*, 1996).

O *Plectranthus ecklonii* Benth. é tradicionalmente usado na África do Sul para o tratamento de distúrbios gástricos, náuseas, vômitos e meningite (Lukhoba *et al.*, 2006), sintomas normalmente associados à infecção por listeriose. A partir do extracto de acetato de etilo de *P. ecklonii* foram isolados dois conhecidos abietanos, a parviflorona D **(1)** e a parviflorona F **(2)**, e ambos os compostos revelaram ser activos contra a *Listeria monocytogenes* (Nyila *et al.*, 2009). O uso tradicional de *Plectranthus ecklonii* Benth. para o tratamento de distúrbios gastrointestinais pode também estar relacionado com a sua actividade contra a *Escherichia coli* (Nyila, 2010), embora sejam necessários mais estudos que suportem esta hipótese.

Os abietanos **(1)** e **(2)** também foram activos contra *Mycobacterium smegmatis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* (Nyila, 2010). A actividade antibacteriana do sugiol **(27)** também foi testada embora os autores tenham reportado uma actividade muito baixa contra a bactéria Gram-positiva *E. faecalis*. (Simões *et al.*, 2010).

As folhas da planta são usadas para sintomas respiratórios, dor torácica e tosse (problemas relacionados com a tuberculose), o que pode dever-se à actividade inibitória do crescimento da *Mycobacterium tuberculosis* apresentada pela parviflorona D **(1)** (Nyila *et al.*, 2009).

A parviflorona D **(1)** também inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* (Nyila *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2010), o que possivelmente justifica o uso das partes aéreas da planta no Zimbabwe para doenças de pele e problemas de hiperpigmentação (Lukhoba *et al.*, 2006). De facto, tem sido relatada a actividade antibacteriana da parviflorona D **(1)** contra espécies de *Staphylococcus* e *Enterococcus*, incluindo contra estirpes MRSA e VRE (Simões *et al.*, 2010).

Mesmo o derivado 2β-(4-hidroxi)benzoiloxi-abietano (**35**) obtido por Simões *et al.* (2010) a partir da parviflorona D (**1**), quando testado contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e contra a levedura *Candida albicans*, demonstrou possuir actividade antibacteriana.

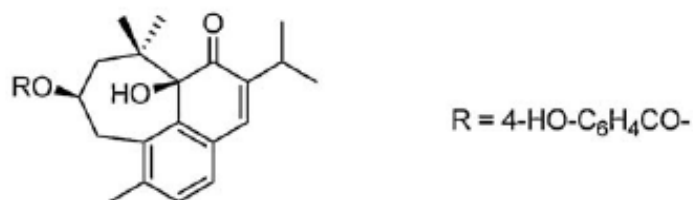


Figura 17. 2β-(4-hidroxi)benzoiloxi abietano (**35**) (Simões *et al.*, 2010).

De acordo com Cowan (1999), o mecanismo responsável pela actividade antibacteriana dos diterpenos pode estar associado à ruptura da membrana bacteriana pelos compostos lipofílicos.

Os extractos de diclorometano de *P. ecklonii* foram testados na actividade antibacteriana e antifúngica pelo método de difusão em agar pelas técnicas de difusão em poço e *trench diffusion*. Embora ambos os métodos tenham produzido resultados inconsistentes, foi observada uma elevada actividade biológica quando o *P. ecklonii* foi testado contra espécies de *Candida* pela técnica de *trench diffusion* (Gurlal, 2005).

3.2.1.1. Actividade anti-listeria

O elevado custo dos fármacos sintéticos e o problema das multirresistências exigiram a necessidade de explorar o potencial anti-listeria de plantas medicinais. Os extractos vegetais são acessíveis e económicos, o que levou ao uso de plantas medicinais como alternativa no tratamento de listeriose. O *Plectranthus ecklonii* Benth. é uma das plantas tradicionalmente usadas para tratar os sintomas associados com a infecção por listeriose (Lukhoba *et al.*, 2006).

Muitos organismos, incluindo o agente patogénico oportunista *Listeria monocytogenes*, surgem mais frequentemente como biofilmes. O extracto de acetato de etilo de *Plectranthus ecklonii* apresentou actividade anti-listeria com uma concentração mínima inibitória (CMI) de 0,5 mg/ml. As parvifloronas D (**1**) e F (**2**) exibiram uma actividade na ruptura do biofilme de *L. monocytogenes* ainda superior, com uma CMI de 15,6 µg/ml e 31,25 µg/ml, respectivamente (Nyila, 2010).

Embora os resultados ilustrem uma possível utilização dos compostos como agentes desinfectantes, devem ser realizados mais estudos no sentido de averiguar o seu potencial na remoção efectiva do biofilme listeriano de superfícies contaminadas.

3.2.1.2. Actividade antiplasmódica

Actualmente, a malária constitui uma das preocupações de saúde pública a nível mundial devido a factores como as resistências à quimioterapia, condições de higiene precárias, fraco controlo vectorial e inexistência de vacinas aprovadas. Tem havido um apelo geral ao uso de produtos naturais como medicamentos ou como base para o desenvolvimento de novos antimaláricos, de modo a evitar os problemas relacionados com as resistências (Onguéné *et al.*, 2013).

Dos quatro tipos de parasitas associados à malária humana, o *Plasmodium falciparum* é o responsável pelos casos mais graves, daí ser usado na maioria dos estudos que avaliam a actividade de compostos nestas espécies (Bero *et al.*, 2009).

As propriedades antimaláricas das espécies de *Plectranthus* foram determinadas por Van Zyl *et al.* (2008). Foram isolados sete abietanos diterpênicos, incluindo as parvifloronas D **(1)**, F **(2)** e E **(9)**, e foi testada a sua actividade antiplasmódica e a capacidade de inibição da formação da β -haematina. As parvifloronas D **(1)** e F **(2)** foram isoladas a partir das folhas de *P. ecklonii* e exibiram actividade antiplasmódica (Van Zyl *et al.*, 2007).

A natureza lipofílica dos diterpenos abietânicos permite-lhes atravessarem facilmente as membranas eritrocitárias e parasitárias para se acumularem no vacúolo dos parasitas. Aparentemente, o efeito inibitório destes compostos relaciona-se com a capacidade de inibir a formação da β -haematina. O composto **(2)** foi mais eficaz do que a quinina e 62% tão activo quanto a cloroquina, dois antimaláricos convencionais. A parviflorona E **(9)** isolada de *P. purpuratus* (subespécie *tongaensis*) também revelou ser mais activa que a quinina. Quando combinados com a quinina, os compostos **(2)** e **(9)** interagiram de maneira aditiva (Van Zyl *et al.*, 2008).

A maioria dos diterpenos é conhecido por combinar elevada actividade antiprotozoária com elevada toxicidade para as células dos mamíferos (por exemplo, células epiteliais renais), células do hepatoma e células de carcinoma do cólon. O perfil citotóxico destes compostos indicou um baixo grau de especificidade para o parasita da malária, tornando-os, à partida, fracos candidatos para o desenvolvimento de antimaláricos.

Contudo, os autores sugerem que usando formulações mais apropriadas e análogos do composto **(2)**, poderiam manter ou aumentar a actividade antimalárica reduzindo a toxicidade (Van Zyl *et al.*, 2008).

De acordo com Bero *et al.* (2009), o diterpeno sugiol **(27)** é também um promissor agente antimalárico com um valor de concentração necessária para inibir 50% da actividade (IC₅₀) entre 1,4 µM e 3,4 µM.

A Tabela 2 resume os microorganismos estudados pelos investigadores para avaliarem a actividade antimicrobiana dos diterpenos abietânicos isolados de *P. ecklonii* Benth.

Tabela 2. Resumo da actividade antimicrobiana apresentada pelos diterpenos abietânicos isolados de *P. ecklonii* Benth.

Microorganismo	Parv D (1)		Parv F (2)		Sugiol (27)	Ref.
	CMI (µg/ml)	IC ₅₀ (µM)	CMI (µg/ml)	IC ₅₀ (µM)	CMI (µg/ml)	
<i>S. aureus</i> ATCC 43866	15.62				62.5	Simões <i>et al.</i> , 2010
<i>S. aureus</i> CIP 106760	15.62					
<i>E. faecalis</i> ATCC 51299	7.81					
<i>E. faecalis</i> FFHB	3.90					
<i>M. smegmatis</i>	39.06		39.06			Nyila <i>et al.</i> , 2009
<i>M. tuberculosis</i>	190		95			
<i>L. monocytogenes</i>	15.6		31.25			
<i>E. coli</i>	31.25		31.25			Nyila, 2010
<i>P. aeruginosa</i>	31.25		31.25			
<i>P. falciparum</i>		5.3		3.11		Van Zyl <i>et al.</i> , 2008

3.2.2. Actividade antioxidante

O actual estilo de vida provoca excesso de produção de radicais livres e espécies reactivas de oxigénio (ROS). Os radicais livres são gerados através de reacções normais que ocorrem dentro do corpo durante a respiração em organismos aeróbios, e que podem exercer diversas funções como funções de sinalização e oferecer defesa contra infecções (Sharma *et al.*, 2012).

Muitas doenças degenerativas, incluindo cancro, doenças cardio e cerebrovasculares, têm sido reconhecidas como possíveis consequências dos danos causados pelos radicais livres nos lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (Choi & Lee, 2009), pelo que é importante descobrir compostos naturais com boa capacidade de eliminação destes ROS.

O conhecimento do modo como os radicais livres intervêm em vários processos patológicos humanos, incentivou o uso de diterpenos como medicamentos naturais para prevenir e tratar algumas doenças humanas, nomeadamente a aterosclerose e a proliferação de células tumorais, além da sua conhecida utilidade na indústria alimentar (Gaspar-Marques *et al.*, 2008).

Em 2005, Chao *et al.* referiram que, embora o sugiol (**27**) apresentasse baixa actividade inibitória do radical 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH), podia reduzir efectivamente a produção intracelular de ROS em macrófagos estimulados por lipossacarídeos (LPS). Recentemente, a actividade antioxidante do sugiol foi novamente investigada e comparada com um composto padrão, o ácido ascórbico (Bajpai *et al.*, 2014). Desta vez, o sugiol (**27**) apresentou actividade antioxidante e de eliminação de radicais livres (DPPH, óxido nítrico, superóxido e radicais livres hidroxilados) significativa e dependente da concentração. Além disso, o sugiol demonstrou um efeito inibitório da peroxidação lipídica de 76,5% em comparação com o α -tocoferol (80,13%) e o butil-hidroxianisol (BHA) (76,5%), dois conhecidos antioxidantes sintéticos.

Outro diterpeno isolado a partir do *Plectranthus ecklonii* que demonstrou actividade anti-radicalar dose-dependente foi a parviflorona D (**1**). Este composto apresentou propriedades antioxidantes equivalentes (IC_{50} $0,1125 \pm 0,0177$ mM) ao hidroxibutiltolueno (BHT) mas inferiores à quercetina, outros dois antioxidantes sintéticos (Rijo *et al.*, 2009).

A actividade antioxidante das parvifloronas F (**2**) e E (**9**), isoladas das folhas do *Plectranthus nummularius* Briq., também foi avaliada pelo método do DPPH. Ambos os compostos apresentaram capacidade de captação do radical DPPH superior à do α -tocoferol (Narukawa *et al.*, 2001).

3.2.3. Inibição enzimática: Tirosinase e AChE

A tirosinase é a enzima que catalisa a biossíntese da melanina, o pigmento chave na coloração de pele, cabelo e olhos. Tem sido crescente a busca de produtos que actuem de maneira segura e eficaz na prevenção da hiperpigmentação por inibição da oxidação enzimática (Nerya *et al.*, 2004).

Tradicionalmente, a pasta feita a partir das folhas do *P. ecklonii* é usada pelos sul-africanos para o problema da hiperpigmentação da pele. A acção inibidora da tirosinase pelo extracto de acetato de etilo de *P. ecklonii* e pelas parvifloronas (**1**) e (**2**) isoladas, foram por isso testadas (Nyila, 2010). A concentração de extracto à qual metade da actividade da tirosinase foi inibida (IC_{50}) foi de $61,73 \pm 2,69$ μ g/ml. No entanto, os resultados dos testes de

citotoxicidade mostraram que os compostos isolados **(1)** e **(2)** foram tóxicos contra as linhas celulares renais Vero (macaco). Ainda assim, a actividade demonstrada pelo extracto bruto de *P. ecklonii* no ensaio da tirosinase, aliada à sua actividade antibacteriana contra *S. aureus*, justificam o uso tradicional da planta em doenças relacionadas com a pele (Lukhoba *et al.*, 2006).

A literatura indica que os terpenóides e, em particular, alguns diterpenóides podem ter actividade anti-acetilcolinesterase. A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Dvir *et al.*, 2010). Actualmente, a terapia mais eficaz para a doença de Alzheimer consiste no aumento dos níveis de acetilcolina através da inibição da actividade da AChE (Falé *et al.*, 2009).

Entre as plantas investigadas para o tratamento da demência, estão os registos do uso de espécies *Salvia* (Lamiaceae) para a perda de memória na medicina popular europeia (Orhan *et al.*, 2007). De facto, os primeiros diterpenos a serem reconhecidos como inibidores da AChE foram duas *orto*-quinonas diterpénicas, a dihidrotanshinona **(36)** e a criptotanshinona **(37)**, isoladas da *Salvia miltiorrhiza* (Ren *et al.*, 2004).

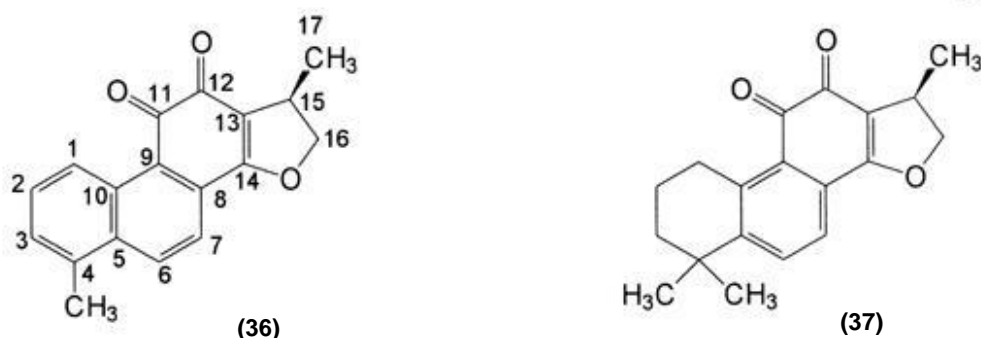


Figura 18. Dihidrotanshinona **(36)** e criptotanshinona **(37)**, diterpenos isolados da *Salvia miltiorrhiza* com actividade inibitória da AChE (Ren *et al.*, 2004).

A dihidrotanshinona **(36)** apresentou uma actividade sete vezes superior à da criptotanshinona **(37)**, sugerindo que um anel A do tipo aromático talvez contribua mais para a actividade inibitória do que um anel A do tipo ciclo-hexano (Wong *et al.*, 2010). Enquanto compostos individuais, os diterpenos tendem a ser mais potentes do que os extractos completos, mostrando a importância do seu carácter lipofílico por facilitar a sua passagem através da barreira hemato-encefálica (Ren *et al.*, 2004).

Dentro da família Lamiaceae, há ainda relatos de diterpenos *ent*-kaurenos isolados da *Sideritis arguta* com actividade anticolinesterase (Ertaş *et al.*, 2009). Não foram encontradas na literatura referências ao efeito inibitório da AChE por parte dos diterpenos com esqueleto abietano isolados de *P. ecklonii*.

3.2.4. Actividade anti-inflamatória

A potencial actividade anti-inflamatória do sugiol (**27**) e a relação entre a transdução de sinal e as citocinas inflamatórias foi avaliada *in vitro* por Chao *et al.* 2005. Uma dose de 30 μM de sugiol inibiu eficazmente a produção das citocinas pró-inflamatórias pro-interleucina-1beta (proIL-1 β), IL-1 β e factor de necrose tumoral-alfa (TNF- α), sugerindo que o sugiol é bioactivo contra a inflamação. Além disso, o sugiol revela uma capacidade para suprimir a activação das proteíno-cinases activadas por mitógenos (MAPKs).

Os autores sugeriram que a eficácia do sugiol para inibir as citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α poderia ser atribuído a uma redução de ROS, o que por sua vez causaria uma diminuição da fosforilação das MAPKs.

3.2.5. Actividade antitumoral

Os diterpenos com esqueleto abietano apresentam uma série de actividades biológicas incluindo actividade citotóxica e antiproliferativa das células tumorais humanas (Burmistrova *et al.*, 2013). Os abietanos, em especial os que contêm porções de quinona, merecem grande atenção dado que muitos dos actuais agentes quimioterápicos também a possuem (Fronza *et al.*, 2012).

As membranas biológicas são potenciais alvos dos diterpenos abietânicos devido ao seu carácter lipofílico. Estudos sugerem que a morte celular induzida por estes compostos não siga apenas um mecanismo mas sim vários. Também é possível que as propriedades estruturais dos diterpenos possam influenciar ou determinar o seu modo molecular de morte celular.

O sugiol (**27**) foi reportado por possuir uma modesta actividade inibidora do crescimento de linhas celulares humanas de cancro da mama, pulmão e cólon (Son *et al.*, 2005).

O sugiol obteve quase 100% de eficácia na inibição da actividade transcripcional do receptor andrónico (RA) em células de cancro da próstata a uma concentração de 25 μM (IC_{50} de 2,64 μM) (Tu *et al.*, 2007).

Num estudo com linhas celulares humanas MIA PaCa-2 (linha celular de adenocarcinoma pancreático), a actividade de relaxamento das topoisomerases I e II do ADN humano foi influenciada pelo sugiol. O diterpeno inibiu preferencialmente a topoisomerase I (IC_{50} de 2,8 μM) exibindo valores de IC_{50} muito inferiores aos apresentados pela camptotecina (28,0 μM), o inibidor clássico da topoisomerase I (Fronza *et al.*, 2012).

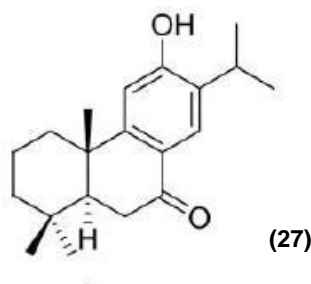


Figura 19. Estrutura química do Sugiol (**27**) (Córdova *et al.*, 2006).

3.3. BIOACTIVIDADE DOS TRITERPENOS E ESTERÓIS ISOLADOS DE *Plectranthus ecklonii* Benth.

3.3.1. Bioactividade dos Ácidos Triterpénicos

O ácido oleanólico (**13**) (ácido 3 β -hidroxi-olea-12-en-28 óico) e o seu isómero, o ácido ursólico (**12**) (ácido 3 β -hidroxi-urs-12-en-28 óico), são compostos triterpénicos que existem nas plantas na forma de ácidos livres ou agliconas (saponinas de triterpenos).

O ácido ursólico (**12**) e os seus derivados têm mostrado possuir actividade antimicrobiana, por exemplo como inibidores do crescimento de *Staphylococcus aureus*, organismos Gram-negativos (*P. aeruginosa* e *E. coli*) e *Microsporium lenosum* (Zaletova *et al.*, 1986). O ácido oleanólico (**13**) revelou actividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) e MRSA (Sun *et al.*, 2006).

Os ácidos (**12**) e (**13**) também têm sido descritos como potentes agentes contra espécies de *Leishmania*. Quando isolados a partir do extracto acetónico das raízes da *Salvia cilicica* (Lamiaceae), os ácidos triterpénicos demonstraram ter actividade contra as formas amastigotas (IC₅₀ 7-120 nM) e acção moderada nas formas promastigotas (IC₅₀ 51–137 nM) da *Leishmania donovani* e da *L. major* (Tan *et al.*, 2002).

De forma a estabelecer relações estrutura-actividade anti-*Leishmania*, foram preparados alguns derivados do ácido oleanólico (**13**) e comparados os seus valores de IC₅₀. Os resultados desse estudo *in vitro* sugerem que um aumento da lipofilicidade no carbono 17 (C17) é mais relevante para a actividade anti-*Leishmania* do que um aumento da lipofilicidade em C3 (Peixoto *et al.*, 2011).

De entre as diversas actividades farmacológicas atribuídas ao ácido oleanólico (**13**), o potencial antioxidante é uma delas, por se tratar da captação de radicais livres devido, entre outros factores, à sua capacidade sequestradora de ROS.

As aplicações tradicionais de plantas que contenham ácido oleanólico **(13)** ou ácido ursólico **(12)** na medicina popular também são múltiplas, em termos de efeitos anti-inflamatórios, analgésicos, sedativos, hepatoprotectores e cardiotônicos (Liu, 1995; Pollier & Goossens, 2012).

O uso de compostos triterpénicos como os ácidos ursólico **(12)** e oleanólico **(13)** é há muito recomendado no Japão como terapêutica no cancro da pele (Muto *et al.*, 1990), tendo ambos os ácidos inibido eficazmente a promoção e iniciação de tumores na pele em ratos. Preparações cosméticas que contêm um ou os dois ácidos estão inclusive patenteadas no Japão para uso tópico preventivo de cancro da pele (Liu, 1995).

Diversos estudos indicaram que o ácido ursólico **(12)** e os seus derivados inibem o crescimento de células cancerígenas por interrupção do ciclo celular e estimulação da apoptose (Liu, 2005). Em células de cancro do cólon HT-29, o ácido ursólico **(12)** diminuiu a proliferação celular por indução da apoptose acompanhada de activação das caspases 3, 8 e 9 (Andersson *et al.*, 2003; Shan *et al.*, 2009), mostrando ser um potencial agente para o tratamento do cancro colorectal.

Outro estudo sugere o ácido ursólico **(12)** como um potencial agente quimiopreventivo no cancro metastático da mama (Yeh *et al.*, 2010). Existe pelo menos uma preparação farmacêutica patenteada para o tratamento de leucemia não-linfática (granulocítica e monocítica) e sem efeitos adversos a conter o ácido oleanólico **(13)** (Liu, 1986).

De entre as diversas actividades farmacológicas atribuídas ao ácido oleanólico **(13)** sendo a hepatoprotectora uma delas. O ácido oleanólico **(13)** tem sido comercializado na China como um medicamento humano de venda livre (OTC) para o tratamento de doenças hepáticas, tais como a hepatite aguda e crónica e um relatório recente mostra que um extracto, que contém ambos os ácidos **(12 e 13)**, suprimiu significativamente a replicação do vírus da hepatite C (Kong *et al.*, 2013). Perante o potencial antivírico destes compostos, os autores propõem a inclusão destes dois compostos em ensaios clínicos, como monoterapia ou em combinação com outros antivíricos da hepatite C.

Medicamentos à base de plantas com **(12)** e **(13)** são muito utilizados no tratamento e prevenção da diabetes *mellitus* tipo II nas medicinas tradicionais chinesa e indiana (Wang *et al.*, 2013). Estes triterpenóides são relativamente não-tóxicos e ambos têm actividade anti-tumoral significativa (Li *et al.*, 2002). Contudo, a semelhança estrutural para com o colesterol **(11)** confere-lhes baixa solubilidade em água, uma importante desvantagem em termos de biodisponibilidade (Soica *et al.*, 2014), e por conseguinte, um potencial terapêutico reduzido. No entanto, estudos de relação estrutura-actividade têm demonstrado que modificações em

determinadas zonas dos núcleos destes compostos podem conduzir a novos derivados significativamente mais activos (Sun *et al.*, 2006).

3.3.2. Bioactividade dos Esteróis

O sitosterol (**14**) e o estigmasterol (**15**) são os esteróis vegetais mais abundantes e ocorrem em misturas complexas. O interesse nutricional nos esteróis reside no facto de estes possuírem uma estrutura semelhante ao colesterol (**11**) e serem capazes de reduzir o colesterol plasmático e as LDL. No entanto, embora a maioria dos estudos com o estigmasterol (**15**) se centrem na actividade de redução do colesterol, outras bioactividades foram descritas para este composto, nomeadamente um potencial efeito anti-inflamatório (Gabay *et al.*, 2010).

O β -sitosterol (**14**) é usado como um tratamento fitoterápico na hiperplasia benigna da próstata (BPH). Esta aplicação aparece descrita na literatura em quatro estudos randomizados, duplamente cegos e controlados por placebo, que incluíram um total de 519 homens. Três dos estudos reportaram benefícios significativos na percepção dos sintomas e em parâmetros mensuráveis como por exemplo a taxa de fluxo urinário.

Num dos estudos, após os 6 meses de duração, seguiu-se um período de 18 meses de *follow-up*, em que os efeitos benéficos do tratamento com o β -sitosterol se mantiveram (Berges *et al.*, 2000). Embora tenha envolvido 117 indivíduos, são necessários mais ensaios clínicos antes de se concluir sobre a real eficácia da fitoterapia com o β -sitosterol.

3.4. BIOACTIVIDADE DOS ÁCIDOS HIDROCINÂMICOS ISOLADOS DE *P. ecklonii* Benth.

3.4.1. Actividade antimicrobiana

A actividade antifúngica contra o *Aspergillus niger* foi relatada para os compostos nepetoidina A (**4**) e nepetoidina B (**5**) (Grayer *et al.*, 2003). A nepetoidina B também já havia demonstrado actividade contra o *Cladosporium herbarum* (Banthorpe *et al.*, 1989).

O extracto aquoso de *P. ecklonii* foi reportado por possuir actividade antibacteriana contra *Staphylococcus mutans* e *S. sobrinus*, e por inibir a enzima glucosiltransferase (GTF). O principal composto presente no *P. ecklonii* apontado como o responsável por esta actividade foi o ácido rosmarínico (**3**) (Figueiredo *et al.*, 2010).

3.4.1.1. Actividade anticariogénica

A cárie dentária é uma doença infecciosa transmissível considerada como um problema de saúde pública. Embora a flora oral humana seja bastante diversa e complexa, duas espécies de *Streptococcus* têm sido indicadas como agentes etiológicos primários das cáries dentárias, o *Streptococcus mutans* e o *Streptococcus sobrinus*. Um dos factores de virulência mais importantes destas espécies é a sua capacidade em produzir glucosiltransferases (GTFs) e sintetizar glucanos insolúveis em água a partir de sacarose, o que permite que as bactérias adiram firmemente à superfície do dente contribuindo para a formação de placa bacteriana (Song *et al.*, 2006).

A presença do ácido rosmarínico (**3**) no extracto aquoso de *P. ecklonii* foi reportada como responsável pela actividade antibacteriana observada contra o *Staphylococcus mutans* e o *S. sobrinus*, e pela inibição da enzima glucosiltransferase (GTF) (Figueiredo *et al.*, 2010). Comparando os valores obtidos para o extracto e para o composto (**3**), os autores verificaram que o efeito inibitório do ácido na formação de biofilme não se distanciou significativamente do efeito verificado para o extracto aquoso.

Para que haja formação do biofilme, é fundamental que o *S. sobrinus* e o *S. mutans* tenham capacidade de adesão a uma superfície. Logo, se existir no meio compostos que impossibilitem essa adesão, quer o processo de formação do biofilme, quer a sua subsistência estarão comprometidos.

Mais recentemente, o extracto metanólico das folhas do *P. ecklonii* revelou a presença da parviflorona E (**9**) em conjunto com o ácido rosmarínico (**3**) e maior actividade anticariogénica, uma vez que as concentrações inibitórias são mais baixas do que as concentrações requeridas pelo extracto aquoso (Figueiredo *et al.*, 2014). Estes dados confirmam a importância do *P. ecklonii* na prevenção de doenças orais.

Pelo contrário, num estudo *in vitro* da actividade antimicrobiana dos extractos hidroalcoólicos (EtOH/H₂O) do *Rosmarinus officinalis* contra *Streptococcus mutans*, *S. salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, e *Enterococcus faecalis*, nem o ácido rosmarínico (**3**) nem os dois derivados éster a partir dele preparados, apresentaram actividade antimicrobiana (Bernardes *et al.*, 2010). Assim sendo, mais estudos devem ser realizados no sentido de confirmar a verdadeira acção do composto (**3**) contra as espécies *Streptococcus* em causa.

3.4.2. Actividade antioxidante

Os compostos fenólicos das plantas, em particular os ácidos fenólicos, os taninos e os flavonóides são conhecidos como potentes antioxidantes (Ramu *et al.*, 2012). A actividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se à sua capacidade para captarem radicais livres, doar átomos de hidrogénio ou electrões ou quelar metais catiónicos. A sua estrutura é um factor importante para a determinação de relações estrutura-actividade (*structure–activity relationships*, SAR).

Os ácidos hidroxicinâmicos apresentam maior actividade antioxidante que os ácidos hidroxibenzóicos correspondentes, o que pode dever-se ao grupo CH=CH-COOH, que garante maior capacidade para doar iões hidrogénio (H⁺) e estabilizar radicais que o grupo carboxilo.

O ácido cafeico (**18**) actua particularmente bem como dador de átomos de hidrogénio, sobretudo graças à estabilidade extra conferida ao radical fenoxil resultante da interacção com o(s) grupo(s) hidroxilo(s) adjacente(s) por ligações de hidrogénio (Balasundram *et al.*, 2006). Por ter um hidroxilo em posição *para* relativamente à cadeia lateral, também capta facilmente um radical. Além disso, possui um equilíbrio entre a parte hidrofílica e lipofílica, o que lhe facilita o acesso aos locais onde existe vitamina E oxidada podendo regenerá-la (Scott, 1997).

Experiências *in vitro* e *in vivo* comprovaram a excepcional actividade antioxidante do ácido rosmarínico (**3**) contra os danos peroxidativos nas membranas biológicas. O ácido rosmarínico (**3**) protege os neurónios do *stress oxidativo* atenuando significativamente a produção de ROS induzida por H₂O₂ e a morte celular por apoptose, mostrando potencial aplicação em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e doença de Huntington (Bhatt *et al.*, 2013).

Grayer *et al.* (2003) demonstraram que o derivado do ácido cafeico nepetoidina B (**5**), isolado a partir dos extractos aquosos das folhas do *P. ecklonii* possui uma potente actividade captadora de radicais livres. O composto (**5**) foi testado em conjunto com três conhecidos antioxidantes (ácido gálico, ácido rosmarínico (**3**) e ácido cafeico (**18**)), pelo teste do 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH). A Nepetoidina B (**5**) revelou maior capacidade de captar radicais livres do que os ácidos (**3**) (5,2µM) e (**18**) (11,1 µM). A Nepetoidina (**4**) não foi testada por quantidade insuficiente. No entanto, as baixas concentrações da substância resultaram na perda considerável da cor de uma solução de DPPH, sendo provável que a nepetoidina A também apresente uma forte actividade antioxidante.

3.4.3. Inibição enzimática da AChE

Num estudo com o *Plectranthus barbatus*, a presença do ácido rosmarínico (**3**) foi a explicação apresentada para as actividades biológicas detectadas *in vitro*, inibição da AChE e actividade antioxidante. O método de extracção por decocção revelou maior actividade inibidora (31% de inibição) e maior poder antioxidante. Mais espécies de *Plectranthus* foram analisadas pelos autores (*P. ecklonii*, *P. fruticosus*, *P. lanuginosus* e *P. verticillatus*) e os resultados obtidos relacionados com o conteúdo de ácido rosmarínico. O *P. ecklonii* foi a espécie a revelar maior inibição da AChE (62.8%) (Falé *et al.*, 2009).

Num estudo em busca de novas estratégias para o tratamento da doença de Alzheimer, foram investigadas a inibição da AChE *in vitro*, a actividade antioxidante e os compostos bioactivos de cinco espécies diferentes de *Plectranthus*, incluindo o *P. ecklonii*. Os principais componentes detectados nos extractos aquosos foram os ácidos rosmarínico (**3**), clorogénico (**16**) e cafeico (**18**). As decocções apresentaram maior inibição da AChE e maior actividade antioxidante no *P. ecklonii* e no *P. saccatus* (Gomes *et al.*, 2012).

De acordo com estes estudos, pode concluir-se que a melhor forma de avaliar a inibição da AChE pelos ácidos fenólicos de *P. ecklonii* será em extractos aquosos e pelo método de extracção por decocção. Falé *et al.* (2009) também mencionaram que os extractos obtidos das folhas são por norma mais activos do que os obtidos a partir das flores.

3.4.4. Actividade anti-inflamatória

Pensa-se que as propriedades anti-inflamatórias do ácido rosmarínico (**3**) se baseiam na inibição das lipoxigenases (LOX) e ciclooxigenases (COX), na sua interferência na cascata do complemento e na inibição da expressão das citocinas inflamatórias. Foi reportado o efeito anti-tumoral do ácido rosmarínico (**3**) em células do cancro do cólon HT-29, devido à sua capacidade de inibir a activação das COX-2 (Hossan *et al.*, 2014).

Os leucotrienos estão significativamente envolvidos no processo de imunorregulação de várias doenças, incluindo asma, inflamação e várias condições alérgicas. São inicialmente biossintetizados pela 5-LOX a partir do ácido araquidónico.

O ácido cafeico (**18**) tem demonstrado possuir propriedades anti-inflamatórias dado ser um inibidor selectivo da 5-LOX e portanto, da biossíntese dos leucotrienos (Koshihara *et al.*, 1984). Também inibe as proteíno-cinases C (PKC) (Gamaro *et al.*, 2011) e A (PKA) e a activação do NF-κB induzida por ceramidas nas células humanas monocíticas U937 (Nardini *et al.*, 2001). Por conseguinte, descobriu-se que o ácido cafeico diminui o óxido nítrico (NO)

e a produção de prostaglandinas E2 (PGE2) nas células estimuladas por lipopolissacáridos, além de diminuir a regulação dos níveis de mRNA de TNF- α , COX-2 e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Yang *et al.*, 2013).

Outro trabalho demonstrou que os derivados do ácido cafeico exercem acção anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* sendo a sua acção mediada, pelo menos parcialmente, pela recaptação de NO (Cunha *et al.*, 2004).

Nakanishi *et al.* (1990) reportaram a potente inibição da xantina oxidase por ambas as nepetoidinas (**4** e **5**) e em particular pela nepetoidina B (**5**), sugerindo um potencial uso do composto no controlo da hiperuricemia associada à doença da gota.

3.5. BIOACTIVIDADE DOS FLAVONÓIDES ISOLADOS DE *P. ecklonii* Benth.

3.5.1. Actividade antimicrobiana

Vários estudos demonstraram efeito inibidor do crescimento por parte de flavonóides, em particular do flavonol quercetina e da flavona luteolina (**20**), em protozoários dos géneros *Toxoplasma*, *Trypanosoma* e *Leishmania*. A maioria dos estudos envolve a malária e flavonóides isolados por estudos bioguiados de espécies utilizadas na medicina tradicional (Lehane & Saliba, 2008).

A actividade antiplasmódica de onze flavonóides, incluindo as flavonas apigenina (**19**) e luteolina (**20**), foi testada *in vitro* contra uma estirpe sensível à cloroquina (3D7) e uma estirpe resistente à cloroquina (7G8) de *Plasmodium falciparum*. O composto mais activo contra ambas as estirpes foi a luteolina (**20**), com valores de IC₅₀ de $11 \pm 1 \mu\text{M}$ e $12 \pm 1 \mu\text{M}$ para as estirpes 3D7 e 7G8, respectivamente.

Descobriu-se ainda que a luteolina (**20**) previne a progressão do crescimento do parasita além da fase trofozoíta, e que não afecta a susceptibilidade do parasita aos fármacos antimaláricos cloroquina ou artemisinina. A combinação de baixas concentrações de diferentes flavonóides aparenta produzir um efeito antiplasmódico aditivo (Lehane & Saliba, 2008).

Quando isolada a partir do *P. strigosus* (Gaspar-Marques, 2006), a flavona salvigenina (**23**) apresentou uma fraca actividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Revelou-se também um inibidor muito fraco do *S. aureus*, ao contrário da apigenina (**19**), que se revelou activa em estirpes MSSA e do tipo MRSA (CMI 3,9-15,6 $\mu\text{g/ml}$) (Sato *et al.*, 2000).

3.5.2. Actividade antioxidante

A actividade antioxidante dos flavonóides deve-se sobretudo à sua capacidade de recaptação de radicais livres e de quelar metais (Bilto *et al.*, 2012), bem como aos seus efeitos na sinalização celular e na expressão génica (Soobrattee *et al.*, 2005).

Esta acção antioxidante proveniente de plantas usada na dieta que contém polifenóis é frequentemente citada como sendo a propriedade chave subjacente à prevenção e/ou redução de doenças crónicas relacionadas com o *stress* oxidativo e perturbações associadas à idade como as doenças cardiovasculares (p.e., aterosclerose), neurodegenerativas (p.e., Alzheimer), carcinogénese e envelhecimento da pele (Quideau *et al.*, 2011). Basicamente, as propriedades antioxidantes dos flavonóides recaem na sua tendência de oxidar de fenóis a quinonas (Havsteen, 2002).

As duas características estruturais típicas nos flavonóides antioxidantes são: um grupo *ortho*-di-hidroxil (catecol) no anel B e a ligação dupla em C2-C3 combinada com um grupo oxo em C4 (anel C). A primeira serve para doar hidrogénio/electrões de forma a estabilizar os radicais, e a segunda para ligar iões de metais de transição como o ferro e o cobre (Bors *et al.*, 1990).

Dado que a luteolina (**20**) e alguns dos seus glucosidos (p.e., a luteolina-7-O- β -glucosido (**30**)) preenchem estes dois requisitos estruturais (Figura 20), não é de estranhar que várias plantas que contêm luteolina possuam propriedades antioxidantes. A actividade antioxidante da luteolina (**20**) e dos seus glucosidos tem sido associada com a sua capacidade em sequestrar as espécies reactivas de oxigénio e de azoto (López-Lázaro, 2009).

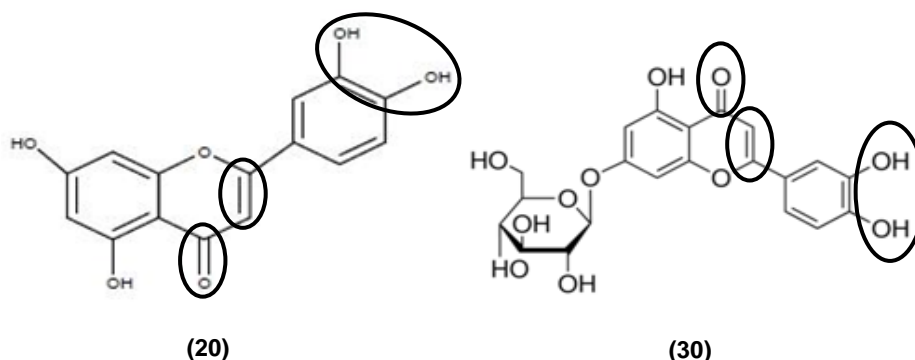


Figura 20. Luteolina (**20**) e luteolina 7-O- β -glucosido (**30**), dois exemplos de flavonóides que cumprem os requisitos estruturais necessários à actividade antioxidante (López-Lázaro, 2009).

Estudos sobre as propriedades quelantes de cobre pelos compostos luteolina-7-O-glucosido (**30**) e luteolina (**20**) sugerem que ambos actuam como doadores de hidrogénio e quelantes de iões metálicos (Brown & Rice-Evans, 1998). A flavona apigenina (**19**), além destas duas acções também inibe a xantina oxidase e a monoamina oxidase, duas importantes enzimas produtoras de ROS (Lin *et al.*, 2002).

Existe ainda na literatura evidências de que a hidroxilação simultânea dos flavonóides em C3 e C5 constitui outra importante característica estrutural envolvida na maximização do potencial de recaptação de radicais livres na determinação de actividade antioxidante (Bors *et al.*, 1990; Soobrattee *et al.*, 2005). Embora possuam estruturas semelhantes, a ausência nas flavonas do grupo hidroxilo em C3 diminui a sua actividade antioxidante face à dos flavonóis.

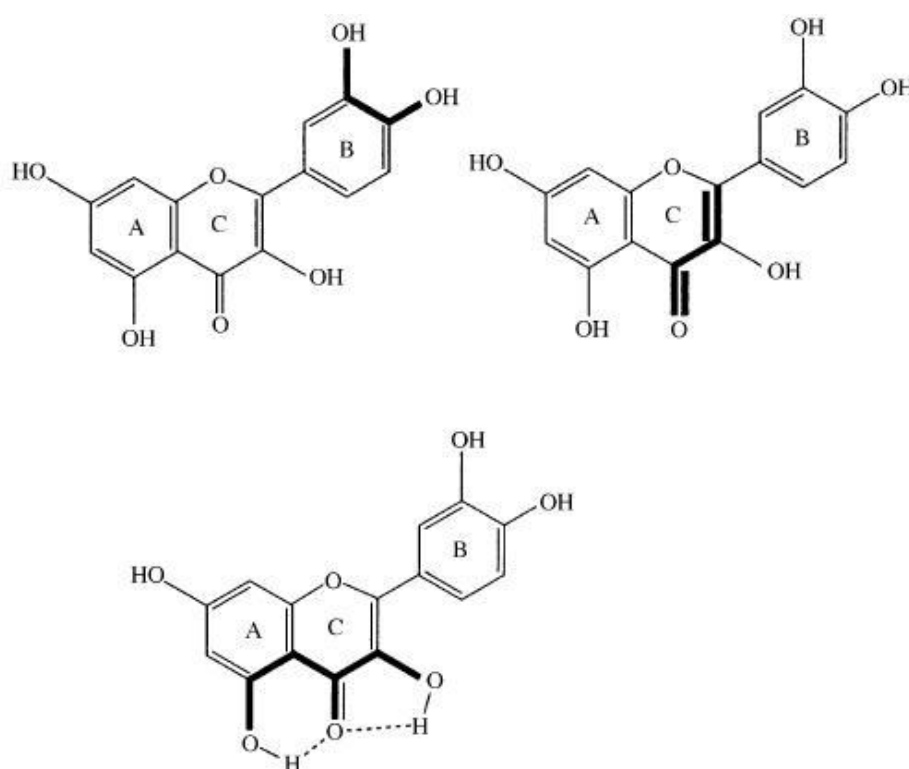


Figura 21. Grupos estruturais envolvidos na captação de radicais pelos flavonóides (Soobrattee *et al.*, 2005).

Além disso, a existência de uma porção de açúcar na posição C8 da vitexina (**21**) diminui significativamente a eficácia antioxidante deste composto em comparação com o seu derivado não glicosilado (**19**) (ver Figura 15) (Soobrattee *et al.*, 2005). A actividade antioxidante das flavonas salvigenina (**23**), cirsimarina (**24**) e genkwanina (**31**) foi avaliada pelos testes qualitativos do DPPH e da descoloração do β -caroteno. Todas apresentaram

resultados negativos no teste do DPPH, o que significa que não são captadoras de radicais por este método. A salvigenina (**23**) foi a única com resultados positivos no teste do branqueamento do β -caroteno, o que pode indicar uma actividade antioxidante preventiva possivelmente relacionada com absorção de radiação UV (Gaspar-Marques, 2006).

Os antioxidantes preventivos podem ser compostos com capacidade de absorver raios UV, as enzimas superóxido dismutase, catalases e peroxidases, ou compostos com capacidade de quelar ou reduzir metais de transição (Scott, 1997). O uso de flavonas no tratamento da doença de Alzheimer foca-se no processo de inflamação subjacente à progressão da doença. Esta abordagem terapêutica baseia-se na acção preventiva das flavonas face ao *stress* oxidativo e consequente inflamação, ao actuarem como antioxidantes por captação de radicais livres.

3.5.3. Actividade anti-inflamatória

O efeito anti-inflamatório dos compostos fenólicos está relacionado com a capacidade de modulação da expressão de enzimas pró-inflamatórias, tais como a fosfolipase A₂ (PLA₂), a óxido nítrico sintase (NOS), ciclooxigenase (COX), lipoxigenase (LOX), mas também com a acção sobre a sinalização do factor nuclear (NF- κ B) e a proteína cinase activada por mitógenos (MAPK), e activação da via Nrf2 /Keap1. A inibição destas enzimas por flavonóides reduz a produção de ácido araquidónico (AA), prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) e óxido nítrico (NO), mediadores cruciais da inflamação (Kim *et al.*, 2004).

Em geral, as flavonas apresentam maior acção inibitória da produção de NO que os flavonóis (Kim *et al.*, 2004). A apigenina (**19**) apresentou forte actividade anti-inflamatória através da inibição da produção de NO e da iNOS, e inibição da expressão da COX-2 (Choi *et al.*, 2014). A inibição da produção de iNOS e NO é também atribuída à luteolina (**20**).

A apigenina (**19**) e a luteolina (**20**) inibem ainda a interleucina 5 (IL-5), que promove o crescimento e a sobrevivência dos eosinófilos e desempenha um papel importante na inflamação alérgica associada a eosinofilia (Packer *et al.*, 2004). Num estudo *in vitro* ambas as flavonas revelaram potente inibição da síntese das IL-4 e IL-13 (Hirano *et al.*, 2004), e ambas exercem acção inibitória sobre as LOX e as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 (Lago *et al.*, 2014).

A nível estrutural, os requisitos para a actividade anti-inflamatória dos flavonóides são: a insaturação no anel C (entre C2 e C3); o número e posição de grupos hidroxilo (p.e. o grupo catecol no anel B); o grupo carbonilo em C4, e a não glicosilação da molécula. No

entanto, compostos que não possuem estas características estruturais (por exemplo, a aglicona campferol), também exibem uma actividade anti-inflamatória, afectando as enzimas da cascata inflamatória (Lago *et al.*, 2014).

As flavonas apigenina (**19**) e luteolina (**20**) estão entre os flavonóides citados como sendo os inibidores mais activos. Os dados na literatura sugerem fortemente que a dupla ligação entre C2 e C3 é crucial para a inibição da produção de NO e que as substituições hidroxilo nos anéis A e B influenciam a actividade inibitória. As hidroxilações nas posições 5- e/ou 7- do anel A, e nas posições 3'- e/ou 4'- do anel B fornecem resultados favoráveis à inibição da produção, acontecendo o oposto se a hidroxilação for no carbono 3 (anel C) (Kim *et al.*, 1999).

O efeito anti-inflamatório da luteolina (**20**), dos seus glucosidos e de plantas que contêm luteolina têm sido reportados em estudos *in vitro* e *in vivo* (López-Lázaro, 2009).

Num estudo *in vitro* de relação estrutura-actividade (SAR), a luteolina (**20**) exibiu uma elevada actividade inibitória da síntese dos tromboxanos e dos leucotrienos, e em particular contra a actividade enzimática dos leucotrienos. A cinarosida (**30**) (luteolina-7-O- β -glucosido) apenas demonstrou actividade inibitória moderada contra ambas as vias de síntese de enzimas (Odontuya *et al.*, 2005). Estes resultados suportam a ideia de que o substituinte hidroxilo na posição C5 do anel A e a não glicosilação da molécula contribuem significativamente para a actividade anti-inflamatória dos flavonóides (ver Figura 20).

Estudos *in vivo* demonstraram que a luteolina (**20**) protege eficazmente a letalidade induzida de ratos por LPSs, sugerindo a aplicação deste composto como um potencial agente terapêutico no tratamento de choque séptico (Chen *et al.*, 2014; Kuo *et al.*, 2011).

3.5.4. Actividade antitumoral

Diversos estudos revelaram que muitos flavonóides, incluindo a luteolina (**20**) e a apigenina (**19**), inibem a proliferação de diversas células, normais e tumorais, derivadas de quase todos os tecidos (Packer *et al.*, 2004).

A apigenina (**19**) mostrou ser um poderoso inibidor da proliferação celular e da angiogénese nas células endoteliais humanas. Inibiu a expressão do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) via degradação do factor indutor de hipóxia alfa-1 (HIF-1 α) (Osada *et al.*, 2004); e o crescimento de células humanas de carcinoma cervical (HeLa) e de linhas celulares de neuroblastoma, um tumor pediátrico (Zheng *et al.*, 2005). A apoptose das células HeLa por indução da expressão do gene p53 sugere o potencial da apigenina (**19**) no desenvolvimento de um agente preventivo do cancro do colo do útero.

Recentemente, outro estudo confirmou esta acção quimiopreventiva da apigenina, desta vez no tratamento do cancro pancreático, por inibição da activação do NF-KB (Wu *et al.*, 2014).

Ainda que não pareça, a actividade anti-proliferativa celular dos flavonóides é específica, consoante o tipo de célula e a estrutura do flavonóide. Por exemplo, nem a apigenina **(19)** nem a luteolina **(20)** apresentam significativa actividade inibidora do crescimento de células 4A5 no melanoma B16 (Packer *et al.*, 2004).

Devido às múltiplas actividades biológicas dos flavonóides (anti-inflamatória, antioxidante, anti-proliferativa e antibacteriana), tem havido muitos estudos no sentido da sua aplicação como agentes anti-tumorais e radiosensibilizadores. O cirsiol **(26)** por exemplo, foi recentemente investigado como possível radiosensibilizador no cancro do pulmão de não-pequenas células (NSCLC) (Kang *et al.*, 2013)

A maioria dos doentes com cancro pulmonar é diagnosticada em estadio avançado e inoperável, sendo a radioterapia a sua única opção de tratamento eficaz. Infelizmente, a radioresistência dos tumores continua a ser um obstáculo crítico (Provencio *et al.*, 2010).

Os resultados demonstram que a rametina (outro flavonóide) e o cirsiol **(26)** reduzem a proliferação das NSCLC por inibição da expressão (mas não da activação) do gene Notch-1 (Kang *et al.*, 2013).

IV. ESTUDO DE QUANTIFICAÇÃO POR HPLC DE DITERPENOS E DE ÁCIDOS FENÓLICOS DE *P. ecklonii* Benth.

4.1. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1. Material Vegetal

As sementes de *P. ecklonii* Benth. foram cedidas pelo herbário do *National Botanic Garden*, Kirstenbosch, África do Sul. As plantas foram cultivadas no horto da Faculdade de Farmácia (Universidade de Lisboa, Portugal) e colhidas em Julho de 1998. A identificação da espécie foi feita pelo Dr. Enrico S. Martins e amostras autênticas foram depositadas no herbário do Instituto de Investigação Científica Tropical (Lisboa) com a referência C. Marques S/Nº (LISC).

4.1.2. Reagentes

Água bidestilada para HPLC, metanol e ácido trifluoroacético, comprados à Merck (Darmstadt, Alemanha).

4.1.3. Metodologias de extracção do material vegetal

Na preparação dos extractos acetónicos aplicaram-se as técnicas de maceração e ultra-sons, de acordo com o descrito por Rijo *et al.* (2007) e por Kubínová *et al.* (2013b), respectivamente.

Os extractos aquosos foram preparados conforme descrito na literatura (Rijo *et al.*, 2014), pelos métodos de decocção, infusão, microondas e ultra-sons.

4.1.4. Análise por HPLC e LC-MS

A análise por HPLC foi realizada num equipamento de HPLC Elite LaChrom® VWR Hitachi equipado com um forno de coluna L-2300 e um detector de foto-diodos (DAD) L-2455 (VWR, EUA). Foi usada uma coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-8 (5 µm). Os extractos foram analisados através de uma injeção no HPLC de 25 µl (1mg/ml) com um injector automático, e usando um gradiente composto pelas soluções A (0.05% ácido trifluoroacético) e B (metanol), como descrito a seguir: 0 min, 80% A, 20% B; 20 min 20% A, 80% B; 25 min, 20% A, 80% B. O fluxo foi de 1 ml/min e a detecção foi levada a cabo entre 200 nm e 500 nm com um detector de foto-diodos.

A parviflorona D **(1)** foi detectada a 430 nm, e a quantidade presente nos extractos da planta estimada por comparação com as áreas dos picos utilizando uma curva de calibração e soluções padrão a partir de uma amostra autêntica.

Os ácidos cafeico **(18)**, rosmarínico **(3)** e clorogénico **(16)** foram quantificados pela integração das áreas dos cromatogramas a 290 nm e por comparação com curvas de calibração construídas com compostos padrão.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Quantificação da Parviflorona D

A quantidade de parviflorona D nos extractos foi estimada por HPLC-DAD, usando uma curva de calibração de construída a partir de uma amostra autêntica.

As quantidades de parviflorona D **(1)** obtidas por extracção aquosa e extracção com fluídos supercríticos foram muito baixas (1-2.4 µg/mg). Pelo contrário, nos extractos acetónicos atingiram-se valores entre 137-166 µg/mg. O valor mais elevado foi obtido no extracto de acetona preparado por ultra-sons (Tabela 3).

Tabela 3. Quantificação por HPLC-DAD de parviflorona D em extractos de *P. ecklonii* (1 mg).

Solvente / Método de extracção	Parviflorona D (µg/mg)
Acetona / maceração	136,75
Acetona / ultrasons	166,10
Acetona / Fluídos supercríticos	2,22
Água / Decocção	2,44
Água / Infusão	1,02
Água / Microondas	1,18
Água / Ultrasons	1,15

4.2.2. Quantificação dos ácidos cafeico, rosmarínico e clorogénico

Os ácidos fenólicos **(18)**, **(3)** e **(16)** foram quantificados pela integração das áreas dos cromatogramas a 290 nm e por comparação com curvas de calibração construídas com compostos padrão.

Tabela 4. Quantificação por HPLC-DAD dos ácidos cafeico (Caf), rosmarínico (Rosm) e clorogénico (Clor) nos extractos de *P. ecklonii* (concentração 1mg/ml).

Solvente / Método de extração	Caf (μM)	Rosm (μM)	Clor (μM)
Acetona / maceração	3,89	43,86	9
Acetona/ ultrasons	5,27	14,33	5,54
Acetona / Flúidos supercríticos	0,78	0	0
Água / Decocção	36,03	224,28	18,81
Água / Infusão	15,83	112,73	11,89
Água / Microondas	20,8	183,86	15,66
Água / Ultrasons	15,34	88,18	10,39

4.3. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

No presente estudo foram avaliados diferentes métodos de extração. Para os extractos acetónicos foram realizados os métodos de maceração, ultra-sons e fluídos supercríticos, e para os extractos aquosos os métodos de decocção, infusão, microondas e ultra-sons.

Em termos de rendimento, os resultados não mostraram diferenças marcadas entre cada método de extração (Tabelas 3 e 4), mas sim entre os solventes usados (acetona e água).

Na extração da parviflorona D **(1)** os extractos acetónicos permitiram detectar quantidades muito superiores (137-166 $\mu\text{g}/\text{mg}$) às obtidas por qualquer método aplicado nos extractos aquosos. O valor mais elevado de parviflorona D **(1)** foi obtido no extracto acetónico preparado por ultra-sons (Tabela 3).

Pelo contrário, na extração dos ácidos hidrocínâmicos, os resultados mostram claramente que teores mais elevados de compostos foram obtidos com o solvente mais polar, ou seja, a água. Das técnicas aplicadas, a decocção foi a que permitiu detectar maiores quantidades de compostos, o que está de acordo com o descrito na literatura (Gomes *et al.*, 2012).

O ácido rosmarínico **(3)** é sem dúvida o composto predominante nos extractos aquosos de *P. ecklonii*. Neste caso, a quantidade de **(3)** detectada pelo método de decocção (224,28 μM) foi cerca de seis vezes superior à quantidade de ácido cafeico **(18)** (36,03 μM) detectado pelo mesmo método (Tabela 4).

V. CONCLUSÕES GERAIS

Com a crescente aceitação da medicina tradicional como uma forma alternativa de cuidados de saúde, surgem também novas exigências. É necessária uma triagem dos compostos que permita elucidar quais os compostos realmente responsáveis pelas actividades biológicas de modo a validar cientificamente os usos populares das plantas.

O género *Plectranthus*, pelas suas diversas aplicações etnobotânicas e pelos diversos efeitos apresentados (antimicrobiano, antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral), tem sido sugerido como uma fonte promissora para a descoberta de compostos bioactivos. Nesse sentido, o isolamento dos metabolitos secundários das espécies *Plectranthus* é muito importante visto que, só conhecendo a origem das propriedades terapêuticas das plantas se poderá garantir uma utilização eficaz e segura.

Para esta dissertação, foi escolhida a espécie *Plectranthus ecklonii* Benth. pois é uma planta alvo de vários estudos em vigor no CBIOS. Numa primeira parte desta dissertação, enumeram-se os vinte e oito compostos isolados até à data no *Plectranthus ecklonii*, o tipo de extracto em que foram isolados e as bioactividades estudadas (Tabela 1). Tal como verificado em outras espécies de *Plectranthus* estudadas ao longo dos anos, as classes predominantes são terpenos e compostos fenólicos.

Atendendo ao facto de os principais compostos desta espécie serem a parviflorona D (**1**) e o ácido rosmarínico (**3**), posteriormente, procedeu-se a um estudo de quantificação por HPLC-DAD da parviflorona D (**1**) e dos ácidos fenólicos rosmarínico (**3**), cafeico (**18**) e clorogénico (**16**), conforme descrito no capítulo IV.

Dos oito diterpenos identificados no *P. ecklonii*, quatro são diterpenos com esqueleto abietano (**1**, **2**, **9** e **27**), dois são triterpenos (**12** e **13**) e dois são esteróis (**14** e **15**).

No que refere a compostos fenólicos, foram isoladas doze flavonas (**19-24**, **26** e **28-31**) e uma flavanona (**25**), além do ácido cafeico (**18**) e de quatro derivados deste (**3**, **4**, **5** e **16**). A literatura reporta o ácido rosmarínico (**3**) como sendo o composto predominante nos extractos aquosos do *P. ecklonii*, o que foi confirmado pelo estudo de quantificação levado a cabo neste trabalho (Tabela 4).

Os estudos fitoquímicos que têm sido relatados com o *P. ecklonii* indicam ainda o isolamento de duas *orto*-quinonas isoméricas, as ecklonoquinonas A (**33**) e B (**34**) (Uchida *et al.*, 1980), as quais não foram alvo de análise neste trabalho por não ter sido encontrada na literatura referência a quaisquer bioactividades por elas exercidas.

Embora os estudos realizados com esta espécie tenham incidido sobretudo na acção antimicrobiana dos seus constituintes, todos os compostos já demonstraram possuir

outras bioactividades, nomeadamente antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral e por isso se procedeu ao levantamento das principais propriedades avaliadas e atribuídas aos diferentes constituintes do *P. ecklonii*. Os estudos citados foram maioritariamente e preferencialmente seleccionados de acordo com a sua realização em outras espécies de *Plectranthus* ou com espécies da família Lamiaceae.

A actividade antimicrobiana atribuída às parviflorona D **(1)** e F **(2)** podem validar muitas das aplicações tradicionais do *Plectranthus ecklonii*, nomeadamente:

- ✓ o seu uso no tratamento de distúrbios gastrointestinais na África do Sul, pode estar relacionado com a actividade destes compostos contra a *Escherichia coli* (Nyila, 2010);

- ✓ o uso de folhas da planta em problemas relacionados com a tuberculose (sintomas respiratórios, dor torácica e tosse), que pode dever-se à actividade inibitória do crescimento da *Mycobacterium tuberculosis* apresentada pela parviflorona D **(1)** (Nyila *et al.*, 2009);

- ✓ a inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* (Nyila *et al.*, 2009; Simões *et al.*, 2010) pela parviflorona D **(1)**, incluindo estirpes MRSA, talvez possa justificar o uso das partes aéreas da planta no Zimbabwe para doenças de pele (Lukhoba *et al.*, 2006).

Esta actividade antibacteriana contra espécies de *Staphylococcus* não é exclusiva da parviflorona D **(1)** (Simões *et al.*, 2010), tendo sido reportada também para a flavona apigenina **(19)** e para os ácidos ursólico **(12)** (Zaletova *et al.*, 1986) e oleanólico **(13)** (Sun *et al.*, 2006). O uso destes ácidos triterpénicos é há muito recomendado no Japão como terapêutica no cancro da pele, existindo inclusive preparações cosméticas patenteadas de carácter preventivo (Liu, 1995).

Ainda no que se refere a aplicações tradicionais, o *Plectranthus ecklonii* é uma das plantas usadas para tratar os sintomas associados à infecção por listeriose. De facto, quer o extracto de acetato de etilo de *P. ecklonii* quer os compostos **(1)** e **(2)**, apresentaram actividade na ruptura do biofilme de *Listeria monocytogenes* (Nyila, 2010). Contudo, devem ser realizados mais estudos antes de se concluir sobre o seu potencial na remoção efectiva do biofilme listeriano de superfícies contaminadas.

As infecções causadas por protozoários parasitas, como por exemplo a malária causada por espécies *Plasmodium*, estão entre as chamadas 'doenças tropicais negligenciadas' que afectam mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo, e para as quais a busca de novos medicamentos é uma necessidade urgente. Fontes naturais, como as plantas e os seus metabolitos podem desempenhar um papel importante nesta área.

As parvifloronas D **(1)** e F **(2)** isoladas a partir das folhas do *P. ecklonii* por Van Zyl *et al.* (2007) exibiram actividade antiplasmódica e capacidade de inibição da formação da β -

haematina. A parviflorona F **(2)** foi tão activa quanto o antimalárico cloroquina e, à semelhança da parviflorona E **(9)**, mais eficaz que a quinina. A natureza lipofílica dos diterpenos abietânicos permite-lhes atravessarem facilmente as membranas eritrocitárias e parasíticas, contudo, a baixa especificidade destes compostos para o parasita da malária, põe em causa o seu emprego no desenvolvimento antimaláricos, embora os autores não descartem completamente esta possibilidade. Bero *et al.* (2009), por exemplo, sugerem que o diterpeno sugiol **(27)** constitui um promissor agente antimalárico.

Os extractos aquosos (Figueiredo *et al.*, 2010) e metanólicos (Figueiredo *et al.*, 2014) de *P. ecklonii* apresentaram ainda efeito inibitório sobre os factores de virulência das duas principais espécies cariogénicas em humanos, *Staphylococcus mutans* e *S. sobrinus*. A existência de compostos fenólicos nestes extractos, nomeadamente a presença de ácido rosmarínico **(3)**, foi a justificação apontada pelos autores para o efeito inibitório sobre a GTF, sugerindo a importância da espécie *P. ecklonii* na prevenção de doenças orais.

Todos os diterpenos isolados no *P. ecklonii* demonstraram actividade antioxidante.

✓ A parviflorona D **(1)** isolada a partir de *Plectranthus ecklonii* demonstrou actividade anti-radicalar dose-dependente (Rijo *et al.*, 2009), propriedades antioxidantes equivalentes ao BHT mas inferiores à quercetina, outros dois antioxidantes sintéticos.

✓ As parvifloronas F **(2)** e E **(9)**, isoladas das folhas de *Plectranthus nummularius* Briq., apresentaram capacidade de captação do radical DPPH superior à do α -tocoferol (Narukawa *et al.*, 2001).

✓ O sugiol **(27)** apresentou actividade antioxidante e de eliminação de radicais livres (DPPH, NO, superóxido e radicais livres hidroxilados) significativa e dependente da concentração (Bajpai *et al.*, 2014).

O potencial antioxidante também é uma das actividades farmacológicas atribuídas ao ácido oleanólico **(13)**, por ser um captor de radicais livres devido, entre outros factores, à sua capacidade sequestradora de ROS.

A actividade antioxidante dos flavonóides deve-se sobretudo à sua capacidade de recaptação de radicais livres e de quelar metais (Bilto *et al.*, 2012), bem como aos seus efeitos na sinalização celular e na expressão génica (Soobrattee *et al.*, 2005).

✓ O ácido cafeico **(18)** actua particularmente bem como dador de átomos de hidrogénio (Balasundram *et al.*, 2006).

✓ O ácido rosmarínico **(3)** protege os neurónios do *stress oxidativo*, mostrando potencial aplicação em doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson e doença de Huntington (Bhatt *et al.*, 2013).

✓ A nepetoidina B (**5**), isolada a partir dos extractos aquosos das folhas de *P. ecklonii* (Grayer *et al.*, 2003), demonstrou possuir uma potente actividade captadora de radicais livres, inclusive superior à dos ácidos rosmarínico (**3**) e cafeico (**18**).

✓ A actividade antioxidante da luteolina (**20**) e do seu glucosido luteolina-7-O- β -glucosido (**30**) pode estar associada com a capacidade destes compostos para sequestrar ROS e espécies reactivas de azoto (López-Lázaro, 2009), e ambos actuam como dadores de hidrogénio e quelantes de iões metálicos (Brown & Rice-Evans, 1998);

✓ A flavona apigenina (**19**) além de doar hidrogénio e quelar iões metálicos, também inibe a xantina oxidase e a monoamina oxidase, duas importantes enzimas produtoras de ROS (Lin *et al.*, 2002).

✓ A salvigenina (**23**) evidencia uma actividade antioxidante preventiva, possivelmente relacionada com absorção de luz UV (Gaspar-Marques, 2006).

Em termos de actividade anti-inflamatória, dos diterpenos existentes no *P. ecklonii*, apenas o sugiol (**27**) reportou efeito ao inibir eficazmente a produção das citocinas pró-inflamatórias proIL-1 β , IL-1 β e o TNF- α (Chao *et al.*, 2005).

O ácido cafeico (**18**) tem demonstrado possuir propriedades anti-inflamatórias dado ser um inibidor selectivo da 5-LOX e portanto, da biossíntese dos leucotrienos (Koshihara *et al.*, 1984). Também inibe proteíno-cinases e a activação do NF-kB, diminuindo o NO, iNOS (Yang *et al.*, 2013) e a produção de PGE2 (Nardini *et al.*, 2001).

A apigenina (**19**) apresentou forte actividade anti-inflamatória através da inibição da produção de NO e iNOS, e inibição da expressão da COX-2 (Choi *et al.*, 2014). A inibição da produção de iNOS e NO é também atribuída à luteolina (**20**). A apigenina (**19**) e a luteolina (**20**) inibem ainda a IL-5, que desempenha um papel importante na inflamação alérgica associada a eosinofilia (Packer *et al.*, 2004).

Efeitos anti-tumorais têm também sido atribuídos a alguns dos constituintes de *P. ecklonii*, em particular, aos ácidos triterpénicos ursólico (**12**) e oleanólico (**13**). Diversos estudos sustentam o seu efeito no tratamento de cancro da pele (Liu, 1995; Muto *et al.*, 1990), cancro colorectal (Andersson *et al.*, 2003; Shan *et al.*, 2009) e leucemia não- linfática (Liu, 1986). O ácido ursólico (**12**) foi também proposto como potencial agente quimiopreventivo no cancro metastático da mama (Yeh *et al.*, 2010).

Foi descoberto que as flavonas luteolina (**20**) e a apigenina (**19**), inibem a proliferação de diversas células, normais e tumorais, derivadas de quase todos os tecidos (Packer *et al.*, 2004).

A apigenina (**19**) mostrou ser um poderoso inibidor da proliferação celular e da angiogénese nas células endoteliais humanas; inibiu o crescimento de células humanas de

carcinoma cervical (HeLa) (Zheng *et al.*, 2005), o que sugere potencial no desenvolvimento de um agente preventivo do cancro do colo do útero. Mais recentemente, outro estudo confirmou esta acção quimiopreventiva da apigenina, desta vez no tratamento do cancro pancreático, por inibição da activação do NF-KB (Wu *et al.*, 2014).

Tem havido muitos estudos no sentido da aplicação dos flavonóides como agentes anti-tumorais e radiosensibilizadores. O cirsilicol (**26**) por exemplo, foi recentemente investigado como possível radiosensibilizador no cancro do pulmão de não-pequenas células (NSCLC) (Kang *et al.*, 2013)

A literatura indica que os terpenóides e, em particular, alguns diterpenóides podem ter actividade anti-acetilcolinesterase, a enzima que catalisa a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (Dvir *et al.*, 2010). Os primeiros diterpenos a serem reconhecidos como inibidores da AChE foram duas *orto*-quinonas diterpénicas, a dihidrotanshinona (**36**) e a criptotanshinona (**37**), isoladas da *Salvia miltiorrhiza* (Ren *et al.*, 2004). Dentro da família Lamiaceae, há ainda relatos de diterpenos *ent*-kaurenos isolados da *Sideritis arguta* com actividade anticolinesterase (Ertaş *et al.*, 2009).

Não foram encontradas na literatura referências ao efeito inibitório da AChE por parte dos diterpenos isolados no *P. ecklonii*. Contudo, esta espécie já demonstrou possuir actividade inibitória da AChE (Gomes *et al.*, 2012). Embora os autores tenham relacionado as actividades observadas com a presença dos ácidos fenólicos (**3**), (**18**) e (**16**), mais estudos devem ser realizados de modo a confirmar quais os compostos envolvidos nesta actividade.

Actualmente, a terapia mais eficaz para a doença de Alzheimer consiste no aumento dos níveis de acetilcolina através da inibição da actividade da AChE (Falé *et al.*, 2009). Novos inibidores da AChE podem contribuir para a concepção de novos fármacos e fornecer informações destinadas a facilitar a compreensão da interacção entre a enzima e os inibidores (Ren *et al.*, 2004).

As plantas são de entre as fontes naturais a mais predominante na obtenção de novas substâncias químicas bioactivas. O seu metabolismo secundário produz uma riqueza imensurável de estruturas químicas que têm sido e continuarão a ser uma fonte de novos fármacos.

No passado, a descoberta de compostos bioactivos a partir de plantas era demorado e complexo mas hoje, com o desenvolvimento de técnicas automatizadas de alta eficiência (HPLC, LC-MS, RMN, etc.), a velocidade já não constitui um passo limitante na descoberta de novos fármacos. Assim, porque não aproveitar o que a natureza nos dá?!

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Mogib, M., Albar, H. A., & Batterjee, S. M. (2002). Chemistry of the genus *Plectranthus*. *Molecules*, 7(2), 271–301.
- Albuquerque, R. L. De, Goretti, M., Silva, D. V., Machado, M. I. L., Matos, F. J. D. A., Morais, S. M. De, & Neto, J. S. (2007). Chemical composition and antioxidant activity of *Plectranthus grandis* and *P. ornatus* essential oils from north-eastern Brazil, 24–26. doi:10.1002/ffj
- Alvarenga, S.A., Gastmans, J.P., Rodrigues, G., Moreno, P., & Emerenciano, V. (2001). A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies - Diterpenes in Lamiaceae. *Phytochemistry*, 56(6), 583–595.
- Andersson, D., Liu, J.J., Nilsson, Å., & Duan, R.D. (2003). Ursolic acid inhibits proliferation and stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase. *Anticancer Research*, 23(4), 3317–3322.
- Ângelo, P.M., & Jorge, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66(1), 1–9.
- Aprotosoaie, A.C., Raileanu, E., Adriana, T., & Cioncă, O. (2013). The polyphenolic content of common Lamiaceae species available as herbal tea products in Romanian pharmacies. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat*, 117(1), 233–237.
- Asif, M., & Khodadadi, E. (2013). Medicinal uses and chemistry of flavonoid contents of some common edible tropical plants. *Journal of Paramedical Sciences*, 4(3).
- Bahadoran, Z., Mirmiran, P., & Azizi, F. (2013). Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*, 12(1), 43.
- Bajpai, V.K., Sharma, A., Kang, S.C., & Baek, K.-H. (2014). Antioxidant, lipid peroxidation inhibition and free radical scavenging efficacy of a diterpenoid compound sugiol isolated from *Metasequoia glyptostroboides*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(1), 9–15.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191–203.
- Banthorpe, D.V., Bilyard, H.J., & Brown, G.D. (1989). Enol esters of caffeic acid in several genera of Labiatae. *Phytochemistry*, 24, 2109–2113.

- Berges, R.R., Kassen, A., & Senge, T. (2000). Treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia with beta-sitosterol: an 18-month *follow-up*. *BJU international*, *85*, 842–846.
- Bernardes, W.A., Lucarini, R., Tozatti, M.G., Souza, M.G.M., Silva, M.L.A., Filho, A.A., *et al.* (2010). Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. *Chemistry & Biodiversity*, *7*(7), 1835–1840.
- Bero, J., Frédérich, M., & Quetin-Leclercq, J. (2009). Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *61*(11), 1401–1433. doi:10.1211/jpp/61.11.0001
- 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. doi:10.7897/2277-4572.02215
- Bilto, Y.Y., Suboh, S., Aburjai, T., & Abdalla, S. (2012). Structure-activity relationships regarding the antioxidant effects of the flavonoids on human erythrocytes. *Natural Science*, *4*(9), 740–747.
- Borghi, S.M., Carvalho, T.T., Staurengo-Ferrari, L., Hohmann, M.S.N., Pinge-Filho, P., Casagrande, R., & Verri, W.A. (2013). Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. *Journal of Natural Products*, *76*(6), 1141–1146.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, *186*, 343–355.
- Brown, J.E., & Rice-Evans, C.A. (1998). Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation *in vitro*. *Free Radical Research*, *29*(3), 247–255.
- Burmistrova, O., Simões, M.F., Rijo, P., Quintana, J., Bermejo, J., & Estévez, F. (2013). Antiproliferative Activity of Abietane Diterpenoids against Human Tumor Cells. *J. Nat. Prod.*, *76*(8): 1413-1423.
- Chao, K-P., Hua, K-F., Hsu, H-Y., Su, Y-C., & Chang, S-T. (2005). Anti-Inflammatory Activity of Sugirol, A Diterpene Isolated from *Calocedrus formosana* Bark. *Planta Med*, *71*, 300-305.
- Chen, D., Bi, A., Dong, X., Jiang, Y., Rui, B., Liu, J., *et al.* (2014). Luteolin exhibits anti-inflammatory effects by blocking the activity of heat shock protein 90 in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *443*(1), 326–32.

- Choi, J.S., Islam, M.N., Ali, M.Y., Kim, E.J., Kim, Y.M., & Jung, H.A. (2014). Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 27–33.
- Choi, Y., & Lee, J. (2009). Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds. *Food Chemistry*, 114(4), 1386–1390.
- Cole, M.D. (1994). Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays—a critical review. *Biochemical Systematics and Ecology*, 22(8), 837–856.
- Córdova, I., León, L.G., León, F., San Andrés, L., Luis, J.G., & Padrón, J.M. (2006). Synthesis and antiproliferative activity of novel sugiol beta-amino alcohol analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41(11), 1327–1332. doi:10.1016/j.ejmech.2006.06.001
- Cowan, M.M. (1999). Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–582.
- Cunha, F.M., Duma, D., Assreuy, J., Buzzi, F.C., Niero, R., Campos, M.M., & Calixto, J.B. (2004). Caffeic acid derivatives: *in vitro* and *in vivo* anti-inflammatory properties. *Free Radical Research*, 38(11), 1241–53.
- Dellar, J.E., Cole, M.D., Waterman, P.G., & Street, G. (1996). Antimicrobial abietane diterpenoids from *Plectranthus elegans*. *Phytochemistry*, 41(3), 735-738.
- Devappa, R.K., Makkar, H.P.S., & Becker, K. (2011). *Jatropha* Diterpenes: a Review. *J Am Oil Chem Soc*, 88, 301–322.
- Dewick, P.M. (2002). *Medicinal natural Products: A Biosynthetic Approach*. (2nd ed.). Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd.
- Dewick, P.M. (2009). *Medicinal natural Products: A Biosynthetic Approach*. (3rd ed.). Chichester, England: John Wiley & Sons, Ltd.
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L., & Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function. *Chem Biol Interact.*, 187(1-3), 10–22. doi:10.1016/j.cbi.2010.01.042
- Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., *et al.* (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Nat. Prod. Rep.*, 23, 394-411. doi: 10.1039/b515312n
- Ertuş, A., Öztürk, M., Boğa, M., & Topçu, G. (2009). Antioxidant and anticholinesterase activity evaluation of *ent*-kaurane diterpenoids from *Sideritis arguta*. *Journal of Natural Products*, 72(3), 500–502.

- Falé, P.L., Borges, C., Madeira, P.J., Ascensão, L., Araújo, M.E.M., Florêncio, M.H., & Serralheiro, M. L.M. (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.
- Figueiredo, N.L., de Aguiar, S.R.M., Falé, P.L., Ascensão, L., Serralheiro, M.L.M., & Lino, A.R.L. (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.
- Figueiredo, N.L., Falé, P.L., Madeira, P.J.A., Florêncio, M.H., Ascensão, L., Serralheiro, M.L.M., & Lino, A.R.L. (2014). Phytochemical Analysis of *Plectranthus* sp . Extracts and Application in Inhibition of Dental Bacteria, *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(7), 794–809.
- Fronza, M., Lamy, E., Günther, S., Heinzmann, B., Laufer, S., & Merfort, I. (2012). Abietane diterpenes induce cytotoxic effects in human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2 through different modes of action. *Phytochemistry*, 78, 107–119.
- Furtado, R.A., Rodrigues, E.P., Araújo, F.R.R., Oliveira, W.L., Furtado, M.A., Castro, M.B., et al. (2008). Ursolic acid and oleanolic acid suppress preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon. *Toxicologic Pathology*, 36(4), 576–580.
- 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. doi:10.1016/j.joca.2009.08.019
- Gamaro, G.D., Suyenaga, E., Borsoi, M., Lermen, J., Pereira, P., & Ardenghi, P. (2011). Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *ISRN Pharmacology*, 2011, 451682. doi:10.5402/2011/451682
- 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), 167–77. doi:10.1080/14786410701654560
- Gaspar-Marques, C. (2006). Estudos fitoquímicos e Atividades biológicas de metabolitos de *Plectranthus grandidentatus* Gürke, *P. strigosus* Benth. e *P. fruticosus* L'Hérit. Tese apresentada ao departamento de Química Farmacêutica e Fitoquímica da Faculdade de Farmácia (Universidade de Lisboa) para obtenção do grau de doutor, orientada por Maria de Fátima Simões, Lisboa.

- Gibbons, S. (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*, 21(2), 263–277.
- Gomes, A., Jerónimo, A., Reis, C., & Rijo, P. (2012). New treatment strategies with plant extracts teas for Alzheimer's disease. *Biomed Biopharm Res.*, (9) 2:242.
- Grayer, R.J., Eckert, M.R., Veitch, N.C., Kite, G.C., Marin, P.D., Kokubun, T., *et al.* (2003). The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry*, 64(2), 519–528.
- 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.
- Gurlal, P. (2005). Testing for microbiologically active compounds extracted from members of the family Lamiaceae and other indigenous plants. Tese apresentada à Faculdade de Ciências e Agricultura da Universidade de KwaZulu-Natal, para obtenção do grau de mestre, África do Sul.
- Hanson, R.H. (2005). Diterpenoids. *Nat. Prod. Rep.*, 22, 594-602.
- Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2-3), 67–202. doi:10.1016/S0163-7258(02)00298-X
- Hawas, U.W., El-Toumy, S.A., & Meyer, J.J.M. (2008). Phenolic constituents and antimicrobial studies on the aqueous methanolic extract of the *Plectranthus ecklonii* leaves. *Planta Med*, 74 – PB2. doi: 10.1055/s-0028-1084349
- Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Naka, T., Shima, Y., Ohshima, S., *et al.* (2004). Flavonoids such as luteolin, fisetin and apigenin are inhibitors of interleukin-4 and interleukin-13 production by activated human basophils. *International Archives of Allergy and Immunology*, 134(2), 135–140. doi:10.1159/000078498
- Hossan, M., Rahman, S., & Bashar, A. (2014). Rosmarinic acid: a Review of its anticancer action. *World Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 3(9), 57–70. [Disponível em <http://isindexing.com/isi/papers/1416053525.pdf> a 23-08-2014].
- Kang, J., Kim, E., Kim, W., Seong, K.M., Youn, H., Kim, J.W., *et al.* (2013). Rhamnetin and cirsiol induce radiosensitization and inhibition of epithelial-mesenchymal transition (EMT) by miR-34a-mediated suppression of Notch-1 expression in non-small cell lung cancer cell lines. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(38), 27343–27357.
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., & Kang, S.S. (2004). Critical Review: Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. *J Pharmacol Sci*, 245, 229–245.

- Kim, H.K., Cheon, B.S., Kim, Y.H., Kim, S.Y., & Kim, H.P. (1999). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, *58*(5), 759–765.
- Kong, L., Li, S., Liao, Q., Zhang, Y., Sun, R., Zhu, X., *et al.* (2013). Oleanolic acid and ursolic acid: novel hepatitis C virus antivirals that inhibit NS5B activity. *Antiviral Research*, *98*(1), 44–53. doi:10.1016/j.antiviral.2013.02.003
- Koshihara, Y., Neichi, T., Murota, S-I., Lao, A-N., Fujimoto, Y., & Tatsuno, T. (1984). Caffeic Acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, *792*, 92-97.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, *89*(3), 217–233.
- Kubínová, R., Švajdlenka, E., Schneiderová, K., Hanáková, Z., Dall'Acqua, S., & Farsa, O. (2013a). Polyphenols and diterpenoids from *Plectranthus forsteri* "Marginatus." *Biochemical Systematics and Ecology*, *49*, 39–42. doi:10.1016/j.bse.2013.03.029
- Kubínová, R., Porízková, R., Navrátilová, A., Farsa, O., Hanáková, Z., Bacinská, A., *et al.* (2013b). Antimicrobial and enzyme inhibitory activities of the constituents of *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth. *J Enzyme Inhib Med Chem, Early Online*: 1-4.
- Kuo, M.-Y., Liao, M.-F., Chen, F.-L., Li, Y.-C., Yang, M.-L., Lin, R.-H., & Kuan, Y.-H. (2011). Luteolin attenuates the pulmonary inflammatory response involves abilities of antioxidation and inhibition of MAPK and NFκB pathways in mice with endotoxin-induced acute lung injury. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(10), 2660–2666.
- Lago, J.H.G., Toledo-Arruda, A.C., Mernak, M., Barrosa, K.H., Martins, M.A., Tibério, I.F., & Prado, C.M. (2014). Structure-activity association of flavonoids in lung diseases. *Molecules*, *19*(3), 3570–3595.
- Lanzotti, V. (2013). Diterpenes for Therapeutic Use. In K.G. Ramawat, J.M. Mérillon (eds.), *Natural Products*, 3173–3191. doi:10.1007/978-3-642-22144-6
- Lehane, A.M., & Saliba, K.J. (2008). Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. *BMC Research Notes*, *1*, 26. doi:10.1186/1756-0500-1-26
- 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.
- Lin, Y., Shi, R., Wang, X., & Shen, H.-M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current Cancer Drug Targets*, *8*(7), 634–646.

- Lin, C.-M., Chen, C.-S., Chen, C.-T., Liang, Y.-C., & Lin, J.-K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(1), 167–172. doi:10.1016/S0006-291X(02)00442-4
- Liu, J. (1995). Review article Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 49, 57–68.
- Liu, J. (2005). Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. *Journal of Ethnopharmacology*, 100, 92-94.
- Liu, Y.G. (1986). Pharmaceutical composition for treating nonlymphatic leukemia and its components. *Chemical Abstracts*, 106.90209j.
- López-Lázaro, M. (2009). Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9, 31–59.
- Lukhoba, C.W., Simmonds, M.S.J., & Paton, A.J. (2006). *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(1), 1–24.
- Martens, S., & Mithöfer, A. (2005). Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry*, 66(20), 2399–2407. doi:10.1016/j.phytochem.2005.07.013
- Misra, P.S., Misra, G., Nigam, S.K., & Mitra, C.R. (1971). Constituents of *Diospyros peregrina* fruit and seed. *Phytochemistry*, 10(4), 904–905.
- Muto, Y., Ninomiya, M. and Fujiki, H. (1990). Present status research on cancer chemoprevention in Japan. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 20, 219-224.
- Nakanishi, T., Nishi, M., Inada, A., Obata, H., Tanabe, N., Abe, S., & Wakashiro, M. (1990). Two new potent inhibitors of xanthine oxidase from leaves of *Perilla frutescens* Britton var. *acuta* Kudo. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 38(6), 1772–1774.
- Nardini, M., Leonardi, F., Scaccini, C., & Virgili, F. (2001). Modulation of ceramide-induced NF-kB binding activity and apoptotic response by caffeic acid in U937 cells: comparison with other antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 30(7), 722–733.
- Narukawa, Y., Shimizu, N., Shimotohno, K., & Takeda, T. (2001). Two new diterpenoids from *Plectranthus nummularius* Briq. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 49(9), 1182–1184.
- Nerya, O., Musa, R., Khatib, S., Tamir, S., & Vaya, J. (2004). Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*, 65(10), 1389–1395.
- Nyila, M.A., Leonard, C.M., Hussein, A.A., & Lall, N. (2009). Bioactivities of *Plectranthus ecklonii* constituents. *Natural Product Communications*, 4(9), 1177–1180.

- Nyila, M.A. (2010). Antilisterial bioactivity and/or biofilm-formation by compounds from *Plectranthus ecklonii* Benth. and *Acacia karroo* Hayne. Tese apresentada ao departamento de Plant Science da Universidade de Pretoria, para obtenção do grau de doutor, orientada por Namrita Lall, África do Sul.
- Odjakova, M., Popova, E., Sharif, M. Al, & Mironova, R. (2012). Plant-Derived Agents with Anti-Glycation Activity. [Disponível em <http://dx.doi.org/10.5772/48186> a 23-10-2014].
- Odontuya, G., Hoult, J.R.S., & Houghton, P.J. (2005). Structure-Activity Relationship for Antiinflammatory Effect of Luteolin and its Derived Glycosides. *Phytother. Res.*, *19*, 782–786.
- Onguéné, A., Onguéné, P.A., Ntie-kang, F., Lifongo, L.L., Ndom, J.C., & Sippl, W. (2013). The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants . Part I : A pharmacological evaluation of alkaloids and terpenoids. *Malaria Journal*, *12*:449.
- 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.
- Osada, M., Imaoka, S., & Funae, Y. (2004). Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1alpha protein. *FEBS Letters*, *575*(1-3), 59–63.
- Packer, L., Ong, C., & Halliwell, B. (2004). *Herbal and Traditional Medicine, Molecular Aspects of Health*. New York: Marcel Dekker.
- Pal, M., Kumar, A., & Tewari, K. (2011). Chemical composition and mosquito repellent activity of the essential oil of *Plectranthus incanus* Link. *Facta Universitatis - Series: Physics, Chemistry and Technology*, *9*(1), 57–64. doi:10.2298/FUPCT1101057P
- Peixoto, J.A., Silva, M.L., Crotti, A.E.M., Veneziani, R.C., Gimenez, V.M.M., Januário, A.H., *et al.* (2011). Antileishmanial activity of the hydroalcoholic extract of *Miconia langsdorffii*, isolated compounds, and semi-synthetic derivatives. *Molecules*, *16*(2), 1825–1833.
- Petersen, M. (2013). Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochemistry Reviews*, *12*(1), 207–227. doi:10.1007/s11101-013-9282-8
- Poolier, J., & Goossens, A. (2012). Molecules of Interest – Oleanolic acid. *Phytochemistry*, *77*, 10-15. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.12.022

- Prasad, N.R., Karthikeyan, A., Karthikeyan, S., & Reddy, B.V. (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.
- Provencio, M., Sánchez, A., Garrido, P., & Valcárcel, F. (2010). New molecular targeted therapies integrated with radiation therapy in lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, 11(2), 91–97.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie*, 50(3), 586–621.
- Rabe, T., & Staden, J. Van. (1997). Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. *Journal of Ethnopharmacology*, 56, 81–87.
- 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), S685–S688.
- Ren, Y., Houghton, P. J., Hider, R. C., & Howes, M. J. R. (2004). Novel diterpenoid acetylcholinesterase inhibitors from *Salvia miltiorhiza*. *Planta Medica*, 70(3), 201–204.
- 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.
- Rijo, P., Chumbo, J., Oliveira, A., Costa, M.C., Rodríguez, B., & Simões, M.F. (2009). Antioxidant activity of two abietane diterpenoids from *Plectranthus* spp. INETI – Posters. [disponível em <http://hdl.handle.net/10400.9/912> a 11-05-2014].
- Rijo, P., Faustino, C., & Simões, M.F. (2013). Antimicrobial natural products from *Plectranthus* plants. In A. Méndez-Vilas editor. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (pp. 922–931). Badajoz: Formatex Research Center.
- Rijo, P., Gaspar-Marques, C., Simões, M.F., Jimeno, M.L., & Rodríguez, B. (2007). Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P. grandidentatus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 215-221.
- 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*, 58, 249-255.

- Rüedi, von P., & Eugster, C.H. (1978). 61. Diterpenoids Drüsenfarbstoffe aus Labiaten: 6 neue *p*-Chinomethane aus *Plectranthus parviflorus* WILLD. *Helvetica Chimica Acta*, 61(2), 709-715.
- Salim, A.A., Chin, Y.-W., & Kinghorn, A.D. (2008). Drug Discovery from Plants. In K. G. Ramawat & J. M. Merillon (Eds.), *Bioactive Molecules and Medicinal Plants* (pp. 1–25). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-74603-4
- Sandhar, H., Kumar, B., Prasher, S., Tiwari, P., Salhan, M., & Sharma, P. (2011). A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 25–41.
- Sato, Y., Suzaki, S., Nishikawa, T., Kihara, M., Shibata, H., & Higuti, T. (2000). Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 72(3), 483–488.
- Scott, G. (1997). *Antioxidants in Science, Technology, Medicine and Nutrition*. Chichester, West Sussex: Albion Publishing.
- Seigler, D. S. (1998). *Plant Secondary Metabolism*. (S. S. & B. Media, Ed.) *Nature* (Vol. 211). New York: Springer Science+ Business Media.
- Shan, J., Xuan, Y., Zheng, S., Dong, Q., & Zhang, S. (2009). Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of HT-29 colon cancer cells by inhibiting the EGFR/MAPK pathway. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 10(9), 668–674.
- 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.
- Simões, M. F., Rijo, P., Duarte, A., Matias, D., & Rodríguez, B. (2010). An easy and stereoselective rearrangement of an abietane diterpenoid into a bioactive microstegiol derivative. *Phytochemistry Letters*, 3(4), 234–237.
- Soica, C., Oprean, C., Borcan, F., Danciu, C., Trandafirescu, C., Coricovac, D., *et al.* (2014). The synergistic biologic activity of oleanolic and ursolic acids in complex with hydroxypropyl- γ -cyclodextrin. *Molecules*, 19(4), 4924–4940.
- Son, K.-H., Oh, H.-M., Choi, S.-K., Han, D.C., & Kwon, B.-M. (2005). Anti-tumor abietane diterpenes from the cones of *Sequoia sempervirens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 15(8), 2019–2021. doi:10.1016/j.bmcl.2005.02.057
- Song, J-H., Kim, S-K., Chang, K-W., Han, S-K., Yi, H-K., & Jeon, J-G. (2006). *In vitro* inhibitory effects of *Polygonum cuspidatum* on bacterial viability and virulence

- factors of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. *Archives of Oral Biology*, 51, 1131-1140.
- Soobrattee, M.A., Neerghen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruoma, O.I., & Bahorun, T. (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579(1-2), 200–213.
- Sun, H., Fang, W.-S., Wang, W.-Z., & Hu, C. (2006). Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids. *Botanical Studies*, 47, 339-368.
- Syamasundar, K.V., Vinodh, G., Srinivas, K.V.N.S., & Srinivasulu, B. (2012). A new abietane diterpenoid from *Plectranthus bishopianus* BENTH. *Helvetica Chimica Acta*, 95(4), 643–646.
- Tan, N., Kaloga, M., Radtke, O., Kiderlen, A.F., Öksüz, S., Ulubelen, A., & Kolodziej, H. (2002). Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. *Phytochemistry*, 61(8), 881–884.
- Tandon, A., Verma, D.I., Adhikari, A., & Khetwal, K.S. (1990). Constituents of the roots of *Plectranthus straitus*. *Fitoterapia*, 62(2): 183.
- Teixeira, A.P., Batista, O., Simões, M.F., Nascimento, J., Duarte, A., De La Torre, M. C., & Rodríguez, B. (1997). Abietane diterpenoids from *Plectranthus grandidentatus*. *Phytochemistry*, 44(2), 325–327.
- Tu, W.-C., Wang, S.-Y., Chien, S.-C., Lin, F.-M., Chen, L.-R., Chiu, C.-Y., & Hsiao, P.-W. (2007). Diterpenes from *Cryptomeria japonica* inhibit androgen receptor transcriptional activity in prostate cancer cells. *Planta Medica*, 73(13), 1407–1409.
- Uchida, V. M., Rüedi, P., & Eugster, H. (1980). 21 . Drüsenfarbstoffe aus Labiaten: Ecklonochinone A und B, zwei neuartige Dibenzo-*p*-dioxin-*o*-chinone aus *Plectranthus ecklonii* BENTH. *Helvetica Chimica Acta*, 63(21), 225-231.
- Van Jaarsveld, E. (2006). *Southern African Plectranthus*. In Fernwood Press (Pty) Ltd, South Africa (ISBN: 9781874950806).
- Van Zyl, R.L., Khan, F., & Edwards, T.J. (2008). Antiplasmodial activities of some abietane diterpenes from the leaves of five *Plectranthus* species. *South African Journal of Science*, 104, 62–64.
- Van Zyl, R.L., Khan, F., Drewes, S., & Edwards, T. (2007). Antiplasmodial activity of abietane diterpenes isolated from five southern African *Plectranthus* species. *Planta Med*, 73 – P_130. doi:10.1055/s-2007-986911

- Waksmundzka-Hajnos, M., & Sherma, J. (2011). High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis. *Chromatographic Science Series*, 102. ISBN: 978-1-4200-9260-8.
- 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.
- Wang, Z., Wang, J., & Chan, P. (2013). Treating Type 2 Diabetes Mellitus with Traditional Chinese and Indian Medicinal Herbs. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2013, Article ID 343594, 17 pages. doi:10.1155/2013/343594
- Wellsow, J., Grayer, R.J., Veitch, N.C., Kokubun, T., Lelli, R., Kite, G. C., & Simmonds, M.S.J. (2006). Insect-antifeedant and antibacterial activity of diterpenoids from species of *Plectranthus*. *Phytochemistry*, 67(16), 1818–1825.
- Wink, M. (2010). Biochemistry of Plant Secondary Metabolism (2nd Ed., pp. 258–303). Oxford, UK: Wiley-Blackwell. doi:10.1002/9781444320503.ch5
- Wong, K. K.-K., Ho, M.T.W., Lin, H.Q., Lau, K.F., Rudd, J.A., Chung, R.C.K., *et al.* (2010). Cryptotanshinone, an acetylcholinesterase inhibitor from *Salvia miltiorrhiza*, ameliorates scopolamine-induced amnesia in morris water maze task. *Planta Medica*, 76(3), 228–234.
- Wu, D.G., Yu, P., Li, J.W., Jiang, P., Sun, J., Wang, H.Z., *et al.* (2014). Apigenin potentiates the growth inhibitory effects by IKK- β -mediated NF- κ B activation in pancreatic cancer cells. *Toxicology Letters*, 224(1), 157–164.
- Xu, R., Fazio, G.C., Matsudi, S.D.T. (2004). On the origins of triterpenoids skeletal diversity. *Phytochemistry*, 65, 261-291.
- 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.
- Yang, W.S., Jeong, D., Yi, Y.-S., Park, J.G., Seo, H., Moh, S.H., *et al.* (2013). IRAK1/4-targeted anti-inflammatory action of caffeic acid. *Mediators of Inflammation*, 2013, 518183. doi:10.1155/2013/518183
- Yeh, C.-T., Wu, C.-H., & Yen, G.-C. (2010). Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells by modulating c-Jun N-terminal kinase, Akt and mammalian target of rapamycin signaling. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(9), 1285–1295.

- Zaletova, N.I., Shchavlinskii, A.N., Tolkachev, O.N., Vichkanova, S.A., Fateeva, T.V., Krutikova, N.M., *et al.* (1986). Preparation of certain derivatives of ursolic acid and their antimicrobial activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 20(5), 345–348.
- Zheng, P.-W., Chiang, L.-C., & Lin, C.-C. (2005). Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sciences*, 76(12), 1367–1379.
- Zschocke, S., Rabe, T., Taylor, J.L.S., Ja, A.K., & Staden, J. Van. (2000). Plant part substitution – a way to conserve endangered medicinal plants?. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 281–292.