

JOANA BARATA COSTA CERVEIRA TAVARES

**ISOLAMENTO DE UM DITERPENÓ BIOACTIVO A
PARTIR DE *PLECTRANTHUS ORNATUS* CODD.**

Orientadora: Prof.^a Doutora Patrícia Dias Mendonça Rijo

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

**Lisboa
2019**

JOANA BARATA COSTA CERVEIRA TAVARES

**ISOLAMENTO DE UM DITERPENÓ BIOACTIVO A
PARTIR DE *PLECTRANTHUS ORNATUS* CODD.**

Dissertação defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona de Humanidades e
Tecnologias no dia 23 de Outubro de 2019,
perante o júri, nomeado pelo despacho de
nomeação do júri nº207/2019 de 2 de Agosto,
com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro
Rodrigues

Agente: Prof. Doutora Margarida Madureira

Orientador: Prof. Doutora Patrícia Rijo

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

**Lisboa
2019**

Lista de publicações

Epole Ntungwe, Vera Isca, Máté Vágvölgyie, Joana Tavares, Gabriella Spengler, Attila Hunyadi, Patrícia Rijo. Bio-guided isolation and biological activity study of coleon U from *Plectranthus mutabilis* Codd. Conference: *Encontro de Ciência'19*, Lisbon, 8-10th July 2019

Vera M. S. Isca, Epole Ntungwe, Joana Tavares, Joana Almeida, Filipa Siopa, Lucília Saraiva, Mattia Mori, Maurizio Botta, Carlos A.M. Afonso, Patrícia Rijo. Molecular docking as a tool to design royleanone derivatives from *Plectranthus* spp. as PKC- δ modulators. *11th iMed.ULisboa Postgraduate Students Meeting & 4th i3DU Meeting*. University of Lisbon, 15th July 2019.

Resumo

A Tuberculose, infeta milhares de pessoas todos os anos sendo um problema grave de saúde pública mundial. O agente causador, *Mycobacterium tuberculosis*, é uma bactéria detentora de mecanismos de sobrevivência elaborados no hospedeiro.

A descoberta de novos antibióticos é essencial para reduzir as mortes por TB e os produtos naturais oferecem um excelente ponto de partida para a descoberta destes compostos devido à sua diversidade estrutural e funcional.

O género *Plectranthus* pertencente à família *Lamiaceae*, como a menta e a sálvia, e exibe uma ampla gama de usos etnobotânicos. A espécie *P.ornatus* tem propriedades: diurética, antipirética, analgésica, antibiótica e anti-inflamatória e é utilizada no alívio de perturbações estomacais e hepáticas.

O diterpeno de esqueleto de halimano (ácido *11R**-acetoxi-halima-5,13*E*-dien-15-óico) foi isolado pela primeira vez a partir de um extrato acetónico do *P.ornatus*. Este composto está descrito quanto à sua actividade antimicrobiana, nomeadamente antibacilar. Deste modo, neste trabalho foi-se isolar o composto em grande escala. Assim, foi realizada uma extração acetónica por ultra-sons (rendimento de extração de 7,082% (m/m)). Também foi realizado o isolamento cromatográfico de 5,3 mg de diterpeno puro, identificado por HPLC-DAD, por comparação com uma amostra autêntica. No futuro será possível o isolamento total do composto neste extrato permitindo novos estudos biológicos com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos tuberculostáticos.

Palavras Chave: *Plectranthus ornatus*, Diterpeno, Halimane, Tuberculose, HPLC.

Abstract

Tuberculosis infects thousands of people every year and is a serious public health problem worldwide. The causative agent, *Mycobacterium tuberculosis*, is a bacterium that has elaborated survival mechanisms in the host.

The discovery of new antibiotics is essential for reducing TB deaths and natural products offer an excellent starting point for the discovery of these compounds due to their structural and functional diversity.

The genus *Plectranthus* belonging to the *Lamiaceae* family, such as mint and sage, exhibit a wide range of ethnobotanical uses. The *P.ornatus* species has diuretic, antipyretic, analgesic, antibiotic and anti-inflammatory properties and is used to relieve stomach and liver disorders.

Haliman's backbone diterpene (11R*-acetoxy halima-5,13E-dien-15-oic acid) was isolated for the first time from an acetone extract of *P.ornatus*. This compound is described due to its antimicrobial, namely antitubercular activity. Thus, in this work the large-scale compound was isolated. Thus, acetonetic ultrasound extraction was performed (extraction yield 7.082% (w / w)). Chromatographic isolation of 5.3 mg of pure diterpene, identified by HPLC-DAD, was also performed by comparison with an authentic sample. In the future it will be possible the total isolation of the compound in this extract allowing new biological studies with potential for the development of new tuberculostatic drugs.

Keywords: Tuberculosis, *Plectranthus ornatus*, Diterpene, Halimane, HPLC.

Abreviaturas e símbolos

1-TbAd 1-*tuberculosinil adenosina*

AB Antibiótico

ACN Acetonitrilo

Anti-TB Tuberculostático

CFU Unidade de formação de colónias

DAD Detector de arranjo de diodos

DPPS *Decaprenildifosfato sintase*

FV Fator de virulência

GGPP Geranilgeranil-difosfato

Hal Ácido 11R*-acetoxi-halima-5,13E-dien-15-óico

HIV Vírus da imunodeficiência adquirida

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

MDR-TB Tuberculose multirresistente a antibióticos

MIC Concentração mínima inibitória

Mtb *Mycobacterium tuberculosis*

PN Produtos naturais

RMN Ressonância magnética nuclear

TB Tuberculose

TFA Ácido Trifluoracético

TLC Cromatografia em camada fina

XDR-TB Tuberculose extensivamente resistente a antibióticos

Índice Geral

Introdução	10
Tuberculose	11
Terpenos e Tuberculose	14
Diterpenos e Tuberculose.....	17
Diterpeno de esqueleto halimano	21
Capítulo I: Parte experimental	28
1. Material	29
1.1 Reagentes.....	29
1.2. Equipamento	29
1.3. Material vegetal.....	30
2. Métodos	30
2.1. Preparação de extratos e rendimento de extração	30
2.2. Fraccionamento e Isolamento	31
2.3. Recristalização.....	32
2.4. Identificação	32
Capítulo II: Resultados e Discussão.....	34
1.Extração.....	35
2. Isolamento	35
3. Recristalização	36
4.Identificação por comparação com amostra autêntica.....	36

Conclusão	37
-----------------	----

Bibliografia.....	38
-------------------	----

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Fármacos de primeira linha para o tratamento da Tuberculose e respectivos mecanismos de acção	12
Tabela 2- Características ideais de um novo antibiótico	13
Tabela 3-Terpenos com efeito anti-bacilar	16
Tabela 4 Algumas potenciais aplicações para diterpenos de esqueleto halimane	23
Tabela 5-Compostos isolados de <i>Plectranthus ornatus</i>	25
Tabela 6-Gradiente utilizado para a detecção do composto Hal, por HPLC	29

Índice de Figuras

Figura 1 - Representação esquemática das duas vias metabólicas referente à síntese de terpenos/terpenóides: via do mevalonato e do 1-desoxilulose-5-fosfato (DXP).....	15
Figura 2 - Esquema da via metabólica de formação dos tipos de diterpenos mais comuns.....	18
Figura 3 - Esquema das reacções catalisadas pelas enzimas Rv3377 e Rv3378 e os seus produtos	19
Figura 4- Estrutura do Nosyberkol, isolado da esponja marinha Raspailia sp.	20
Figura 5- Diterpeno Hal.....	21
Figura 6- Esquema geral da biossíntese de diterpenos de esqueleto Halimane	22
Figura 7- Cálculo do rendimento de extração	30
Figura 8-Esquema do procedimento de extração.....	31
Figura 9- Esquema das cromatografias realizadas	32
Figura 10- Esquema de um aparelho de HPLC.....	33
Figura 11-Espectro de absorção da amostra autêntica.	33
Figura 12- Espectro de absorção da amostra	33
Figura 13-Procedimento para obtenção da amostra	36

Introdução

Tuberculose

A tuberculose (TB) é a décima causa de morte mais comum no Mundo, com 1,6 milhões de mortes em 2017, 0,3 milhões, das quais em co-infetados com Síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV). A incidência de TB tem estado a diminuir 2% ao ano; esta taxa deverá acelerar para 4-5%, com o objetivo de atingir um declínio em 2020, e o fim da epidemia em 2030. (WHO, 2018).

A TB é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) transmitida através de aerossóis contaminados produzidos durante a tosse do doente. Os sintomas provenientes da infecção com *Mtb* incluem hemoptise, febre e perda de peso (Knechel, 2009).

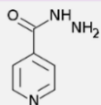
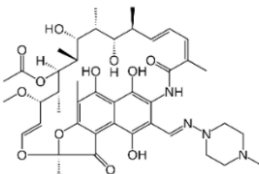
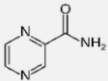
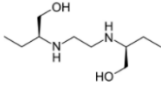
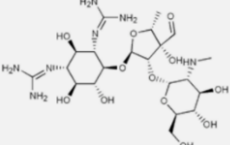
O *Mtb* entra nos alvéolos pulmonares e é fagocitado, ou seja, englobado pelos macrófagos alveolares, formando-se uma vesícula fagocítica. Estas vesículas, geralmente são fundidas com os lisossomas e o seu conteúdo é exposto a hidrolases lisossomais (espécies reativas de oxigénio e nitrogénio) que destroem as bactérias no seu interior. Contudo, o *Mtb* desenvolveu vários mecanismos para contornar este ambiente adverso, como a inibição da fusão fagossoma-lisossoma e a evasão do meio ácido no interior do fagolisossoma. (Forrellad et al., 2013)

A infeção, na maioria dos casos permanece contida no pulmão devido à formação de granulomas. No interior destas estruturas, os macrófagos e outras células do sistema imune cingem o local onde se encontram as micobactérias, limitando a nocividade e disseminação. As micobactérias podem permanecer inativas por décadas sem qualquer sintoma (TB latente), porém em condições imunodepressoras pode desencadear-se doença ativa. (Smith, 2003)

Devido a estruturas de saúde ineficazes (má avaliação da *compliance*), desenvolveram-se duas novas estirpes de *Mtb* resistente a antibióticos (AB). Estas novas estirpes são designadas TB multirresistente (MDR-TB) e extensivamente resistente (XDR-TB). A MDR-TB é causada por *Mtb* resistente a dois anti-TB de 1ª linha, isoniazida e rifampicina. A XDR-TB é causada por estirpes que são resistentes a qualquer fluoroquinolonas e um de três aminoglicosídeos injetáveis (amicacina, canamicina ou capreomicina) (Lawn & Zumla, 2011). O tratamento da TB resistente aos

medicamentos é mais dispendioso e demorado. (Gupta, Kumar, Bisht, & Kaushik, 2017; Samad, Sultana, Akhter, & Aqil, 2008; Sharma & Yadav, 2017) Os fármacos de 1ª linha para o tratamento da TB, encontram-se descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Fármacos de primeira linha para o tratamento da Tuberculose e respectivos mecanismos de acção (adaptado de Samad et al. 2017)

Fármaco	Mecanismo de Acção	Estrutura
Isoniazida	Inibidor da síntese de ácido micólico	
Rifampicina	Inibidor da síntese proteica	
Pirazinamida	Inibidor das funções de síntese e transporte do bacilo	
Etambutol	Disruptor da síntese de compostos da parede celular	
Estreptomicina	Inibidor da síntese proteica	

Novos compostos anti-TB entraram no mercado nos últimos anos, tais como a bedaquilina, PA-824, e delamanida.; porém nenhuma destas moléculas apresenta as características ideais (tabela 2) que um AB deveria ter. (Farah, Abdelrahman, North, & Chauhan, 2015)

Tabela 2- Características ideais de um novo antibiótico (adaptado de Farah, et al, 2015)

Atributos	Propriedades
Duração de tratamento curta	Fármacos potentes e seguros contra a TB latente e populações heterogéneas
Apto para estirpes resistentes	Nova classe de compostos com amplo espectro de acção e baixos níveis de toxicidade
Económico	- Disponibilidade em todo o mundo - Preço apropriado para países em desenvolvimento
Número reduzido de comprimidos	- Fármacos combinados, que reduzam o número de comprimidos que o doente tem de tomar - Formulações aptas para crianças
Pouca interacção entre fármacos	Interações mínimas com outros fármacos, especialmente antivirais, tratamento do HIV e antidiabéticos
Frequência de administração baixa	- Bom bioavaliabilidade e tempo de semi-vida - Novas formulações e tecnologias

Tuberculose e Produtos Naturais

Quase um século após a descoberta da penicilina, os Produtos Naturais (PN) serviram como base para o desenvolvimento da maioria das classes de AB em comercialização (Rossiter, Fletcher, & Wuest, 2017). Dentro do grupo dos AB de origem natural encontram-se dois anti-TB de 1ª linha: a rifampicinas e estreptomicina (extraído pela primeira vez na bactéria *Streptomyces*) (Dias, Urban, & Roessner, 2012). Para impedir a propagação de estirpes multirresistentes, é imperativo criar novos fármacos e estratégias para combater a TB e a natureza fornece uma poderosa fonte de novos compostos antimicrobianos, devido à sua variedade estrutural de metabolitos com múltiplas funções na planta, incluindo defesa contra microorganismos. (De Souza, 2005; Orcid, 2019)

Entre as 420.000 espécies de plantas conhecidas, apenas uma pequena fracção tem estudos sobre a sua actividade biológica, havendo inúmeros projectos a decorrer nesta área. A seleção das plantas é o primeiro passo no programa de descoberta de novos compostos. As várias abordagens de seleção são baseadas em etno-farmacológicos (estudo do uso cultural de medicamentos derivados de substâncias

naturais). As propriedades antibióticas das plantas são conhecidas há mais de 2000 anos (Gupta et al., 2017; Tariq et al., 2019)

Terpenos e Tuberculose

Os terpenos também designados de “alcenos naturais”, são hidrocarbonetos insaturados (com uma ligação dupla entre carbonos), enquanto que os terpenóides são terpenos com presença de oxigénio na sua estrutura. Os terpenos/terpenóides são estruturas de blocos de unidades de isopreno (C_5H_8), normalmente ligadas entre si pela ordem “cabeça-a-cauda” (ligação 1-4). A semelhança na sua estrutura química é resultado da sua origem bioquímica, já que todos os seus carbonos são originários a partir do isopentenil pirofosfato (IPP) ou do seu isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Figura 1). A origem dos terpenos pelo IPP e DMAPP é realizada por duas vias: via do mevalonato e via do 1-desoxilulose-5-fosfato (DXP). (Felipe & Bicas, 2017; Orcid, 2019)

Desta forma, os terpenos podem ser classificados de acordo com a quantidade de blocos de isopreno que a sua estrutura possui: como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) e tetraterpenos (C_{40}). Os terpenos podem ainda ser sub-classificados em termos do grau de ciclização do núcleo da molécula: acíclicos ou lineares, bicíclicos, tricíclicos, tetracíclicos, pentacíclicos e macrocíclicos. (Rijo, 2010b)

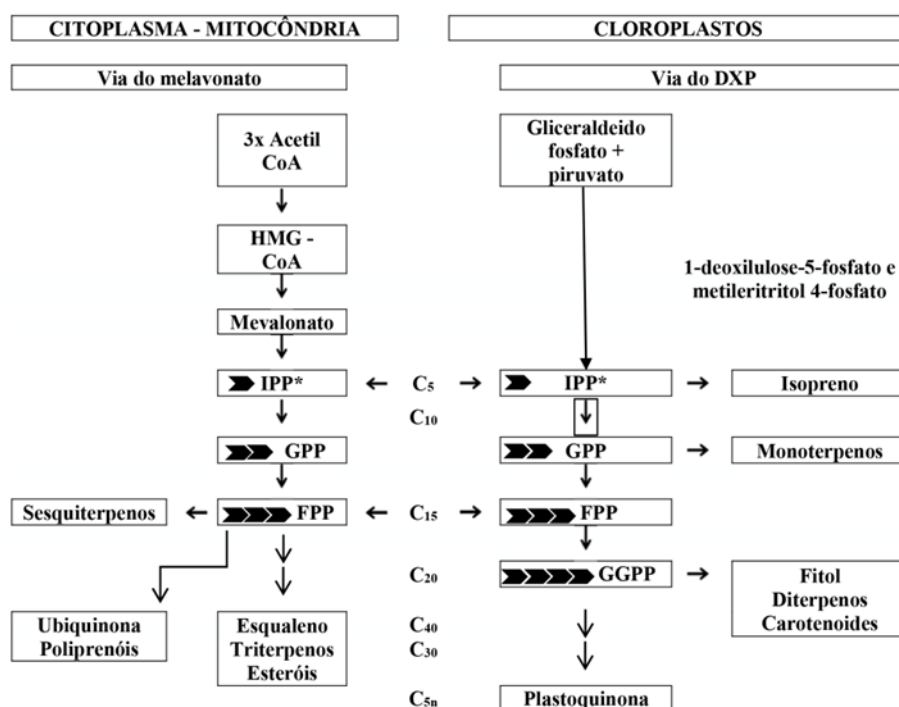
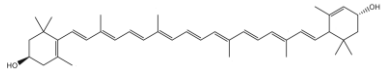
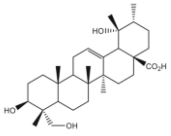
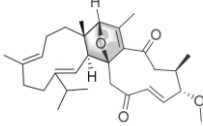
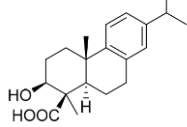
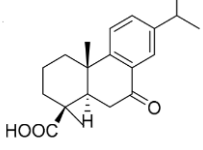
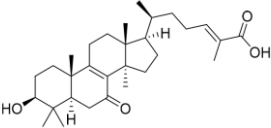
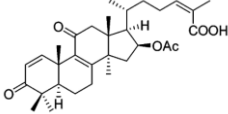
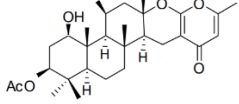
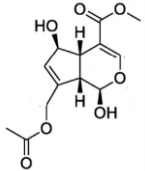
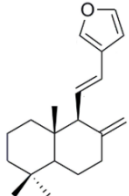
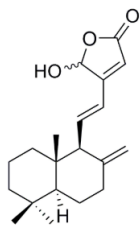
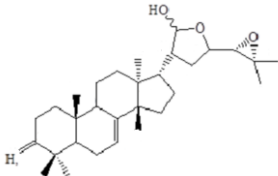
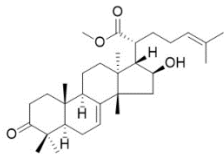
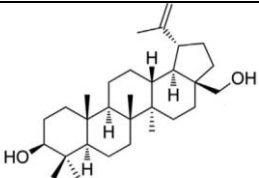


Figura 1 - Representação esquemática das duas vias metabólicas referente à síntese de terpenos/terpenóides: via do mevalonato e do 1-desoxilulose-5-fosfato (DXP). *IPP ou DMAPP. IPP: isopentenil pirofosfato; DMAPP: dimetilalil pirofosfato. GPP: geranil pirofosfato; FPP: farnesil pirofosfato (Felipe &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

Vários terpenos têm sido avaliados quanto à sua actividade antimicrobacteriana. Na tabela 3 encontram-se alguns desses compostos (dados da pesquisa) e a sua estrutura. Para as outras classes de metabolitos vegetais com actividade anti-TB recomenda-se o trabalho de revisão de Sharma e colegas (2017).

Tabela 3-Terpenos com efeito anti-bacilar (Pesquisa na Base dados Pubmed, entre 2015-2019, usando as palavras-chave: natural+products+tuberculosis+terpenoids)

Planta	Estrutura	Nome	Classe	Referência
<i>Oxyanthus speciosus</i>		lutein	tetraterpeno	(Aro et al., 2019)
		rotundic acid	Triterpenóide	
<i>Resina Commiphora</i>		commiphoroid E	Dímero sesquiterpenóide	(Zhu et al., 2019)
		nepetaefolin F	Diterpeno	
		7-oxocallitrisic acid	Diterpeno	
		7-oxo-ganoderic acid Z	Diterpeno	
<i>Macrolepiota procera</i>		Lepiotaprocerin I	Triterpeno	(Chen et al., 2018)
<i>Neosartorya spinosa</i>		1-hydroxychevalone C	meroterpenóide	(Rajachan, Kanokmedhakul, & Sanmanoch, 2016)
<i>Rothmannia wittii</i>		6β-hydroxy10-O-acetylgenipin	iridóide	(Chaipukdee, Kanokmedhakul, Kanokmedhakul, Lekphrom, & Pyne, 2016)
<i>Hedychium ellipticum</i>		coronarin E	diterpeno	(Songsri & Nuntawong, 2016)

		16-hydroxylabda-8(17),11,13-trien-15,16-olide	diterpeno	
<i>Melia azeradach</i>		3-α-tigloyl-melianol	triterpenóide	(Sanna et al., 2015)
		methyl kulonate	triterpenóide	
<i>Alnus incana</i>		betulin	Triterpeno	(Li, Webster, Johnson, & Gray, 2015)

Diterpenos e Tuberculose

Os diterpenos são hidrocarbonetos com vinte átomos de carbono, os diterpenos diversificam-se principalmente através de vias derivadas de labdano, bifurcando-se em um estágio pimarano que origina os esqueletos caurano e o abietano. (Mann, 1987)

Os constituintes das plantas do género *Plectranthus* são sobretudo diterpenos de halimano, abietano, kaurano, clerodano e labdano, juntamente com triterpenóides de ursano, oleanano e triterpenóides de lupano, fitosteróis, flavonóides e outros compostos polifenólicos. (Andrade, Rijo, et al., 2018) As estruturas que os caracterizam originam-se principalmente através de vias derivadas de labdano, que bifurcam em um estágio pimarano que origina os esqueletos caurano e o abietano (Figura 2) (Mann, 1987; Rijo, 2010a)

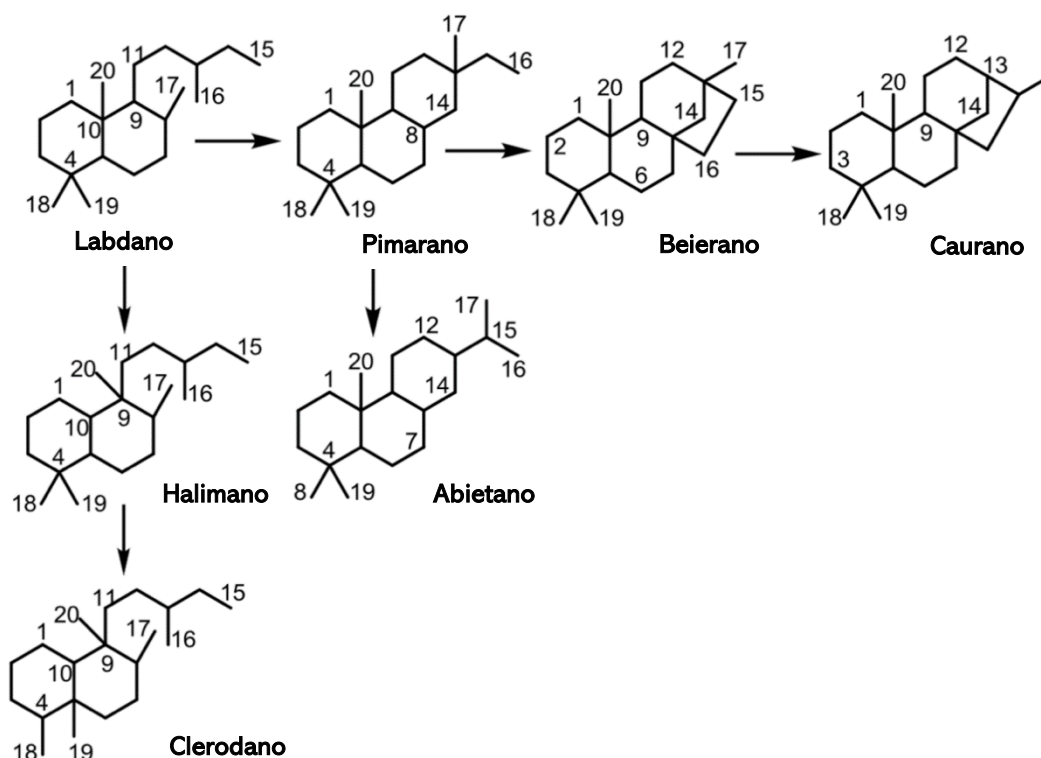


Figura 2 - Esquema da via metabólica de formação dos tipos de diterpenos mais comuns. (Rijo, 2010a).

Os avanços nas áreas de genética molecular e genómica, permitiram identificar vários genes do *Mtb* responsáveis pela sua patogenicidade (Chevalier, Cascioferro, Majlessi, Herrmann, & Brosch, 2014). Estes avanços permitiram a identificação de genes de fatores de virulência (FV). Entenda-se FV, genes cuja ausência no genoma da micobactéria leva a uma perda mensurável na patogenicidade ou virulência, mas não afeta o crescimento bacteriano *in vitro*. Estes fatores são, normalmente, responsáveis por vias catabólicas lipídicas, síntese de proteínas da superfície celular, reguladores e sistemas de transdução de sinal bem como genes envolvidos na sobrevivência dentro do ambiente agressivo da célula hospedeira. (Forrellad et al., 2013)

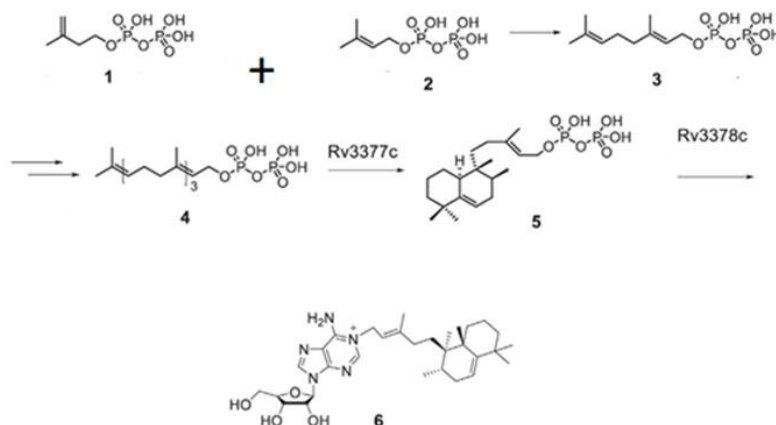


Figura 3 - Esquema das reacções catalisadas pelas enzimas Rv3377 e Rv3378 e os seus produtos (adaptado de Oldfiels, 2015)

O *Tuberculosinil-adenosina isoprenóide* e o *Difosfato de tuberculosinol* são dois FV conhecidos do *Mtb*. Estes compostos são sintetizados a partir de unidades de isopentenil difosfato (1) e dimetilalil difosfato (2). Os compostos 1 e 2, por condensação originam Geranil-difosfato (3), Farnesil-difosfato e Geranilgeranil-difosfato (GGPP; 4). Num segundo passo, o GGPP sofre ciclização por uma terpeno-ciclase de classe II (Rv3377) para formar o *Difosfato de tuberculosinol* (5). (Nakano & Hoshino, 2009) Uma segunda enzima *sintase da Adenosina tuberculosinil* (Rv3378), adiciona uma molécula de adenosina para formar *1-tuberculosinil adenosina* (1-TbAd; 6), esta reacção encontra-se sumarizada na figura 3. (Layre et al., 2014).

A história da descoberta da enzima Rv3377 e Rv3378 começou em 2004, com Pethe e colegas ao estudarem o processo de infeção por *Mtb*. Este grupo de investigação destacou os produtos de um operão, com cinco genes, que codificam a formação de enzimas envolvidas na biossíntese de compostos do tipo isopreno. Mutações em Rv3377 e Rv3378 (pertencentes a este operão) conduziram a um decréscimo relevante da capacidade do *Mtb* para prevenir a maturação dos fagossomas. (Pethe et al., 2004)

No ano seguinte, Nakano e colegas, apresentaram a evidência definitiva de que o produto do gene Rv3377c codificava uma Diterpeno ciclase de classe II produtora de um *Halimadinil-difosfato*. Descreveram a produto deste gene como uma proteína de 501 aminoácidos, com dois alinhamentos característicos, denominados motivos QW e

DXDD (também existentes nas oxidosqualeno e esqualeno ciclases e outras ciclases terpenóides). (Nakano, Okamura, Sato, Dairi, & Hoshino, 2005)

A função de Rv3378 foi sendo estudada por dois grupos (Mann et al., 2009; Nakano & Hoshino, 2009), que divergiam nas conclusões quanto à estrutura e produto desta enzima. Chegando a um erróneo consenso de que os *iso*-tuberculosinóis seriam o produto final, que por coincidência eram iguais aos *nosyberkols* (Figura 4) extraídos de uma esponja marinha *Raspailia sp.*, em 2004 (Maugel, Mann, L.Hilwig, Peters, & Snider, 2010; Rudi, Aknin, Gaydou, & Kashman, 2004). Independentemente da controvérsia gerada chegou-se à noção de que pode ser possível eliminar o *Mtb* no interior dos macrófagos por meio da inibição química das enzimas Rv3377 e Rv3378 (Chan et al., 2014; Maugel et al., 2010; Prach, Kirby, Keasling, & Alber, 2010).

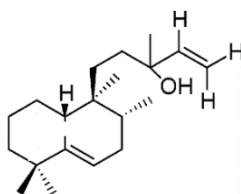


Figura 4- Estrutura do *Nosyberkol*, isolado da esponja marinha *Raspailia sp.*

A polémica chegou ao fim quando outros dois grupos (independentes e diferentes dos anteriores) determinaram separadamente a estrutura do Rv3378. Estes cientistas constataram que a enzima adopta *folding* de *cis-prenil transferase* encontrada nas proteínas decaprenildifosfato *sintase* (DPPS) e *undecalprenil difosfato sintase*, envolvidas na biossíntese da parede celular bacteriana. Além disso, o produto real não seria um *iso*-tuberculosil/*nosyberkol*, mas sim 1-TbAd (6). (Ver figura 2) (Buter et al., 2017)

Ligantes e inibidores destas enzimas foram descritos e o seu desenvolvimento futuro pode levar à descoberta de terapias visando a inibição da formação de fatores de virulência. Por outro lado, descobriu-se que Rv3378 é muito semelhante a outra enzima denominada de Rv2361, envolvida na biossíntese da parede celular do *Mtb*, e é possível inibir as duas enzimas com a mesma substância e ter um mecanismo de acção com duas frentes (Buter et al., 2017; Layre et al., 2014; Oldfield, 2015). O diterpeno **Hal** (figura 5) provou ter actividade anti-TB, e o seu mecanismo de acção poderá ser a

inibição destas enzimas, devido à semelhança estrutural com os seus produtos. (Andrade, Custódio, et al., 2018)

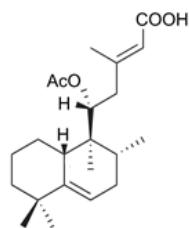


Figura 5- Diterpeno Hal.

Diterpeno de esqueleto halimano

Os diterpenos, podem ser classificados em dois grupos. O primeiro grupo tem o ião pirofosfato na primeira etapa da sua formação; o segundo grupo forma-se por ciclizações, sem recurso ao ião pirofosfato. Os diterpenos de esqueleto labdano, clerodano e halimano pertencem ao segundo grupo. Os diterpenos com esqueleto halimano fazem parte um grupo de metabolitos secundários que podem ser encontrados em diferentes espécies de plantas, organismos marinhos e microrganismos. Algumas potenciais aplicações (tabela 4) para diterpenos de esqueleto halimanos têm sido descobertas na última década, sendo a mais promissora, com tuberculostático e biomarcador da TB. (Roncero, Tobal, Moro, Díez, & Marcos, 2018)

Os diterpenóides tem tido especial atenção devido à sua riqueza em atividades biológicas, descobrindo-se estruturas novas todos os anos. Sabe-se que esses metabolitos são produzidos principalmente a partir de plantas, mas também se encontram fungos, bactérias e organismos marinhos. Os labdanos possuem uma estrutura química do esqueleto C-20, constituída por um núcleo decalina e uma cadeia lateral C-6, cíclica ou alifática. Geralmente exibem cinco estereocentros e podem ocorrer nas séries normal e antipodal. Os halimanos surgem dos labdanos pela migração do grupo metil C-20 da posição C-10 para a C-9. Na Figura 6 encontra-se um esquema geral da biossíntese destes compostos.(Roncero et al., 2018)

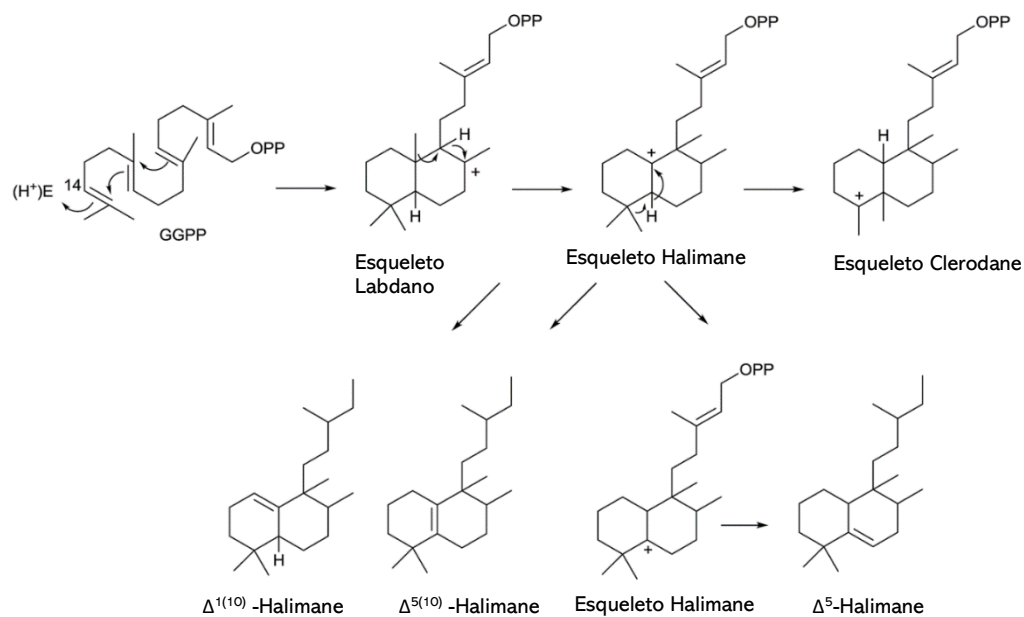
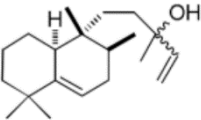
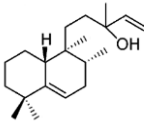
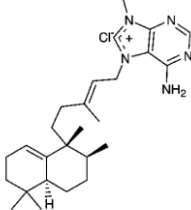
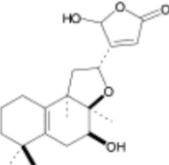
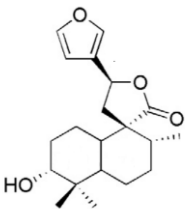
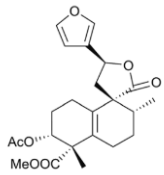
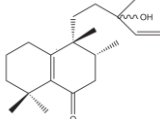
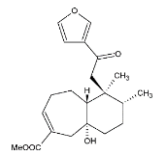
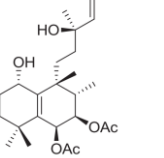
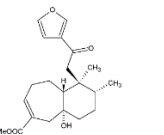
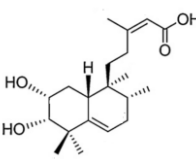
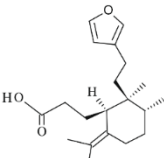


Figura 6- Esquema geral da biossíntese de diterpenos de esqueleto Halimane(Roncero et al., 2018)

Tabela 4 Algumas potenciais aplicações para diterpenos de esqueleto halimane (adaptado de Roncero, et al, 2018)

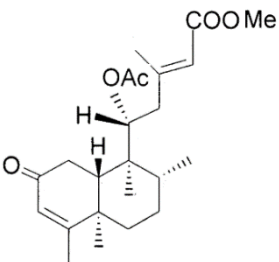
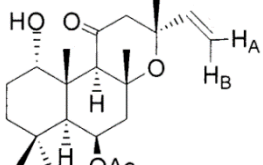
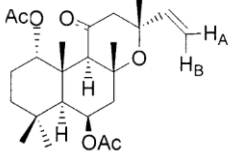
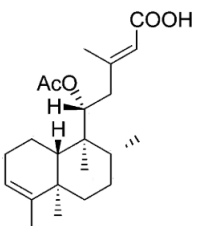
<i>Organismo</i>	<i>Potencial Utilização</i>	<i>Estrutura</i>	<i>Nome</i>	<i>Fonte</i>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Alvo de Antibiótico Biomarcador da TB		<i>Isotuberculosinol</i>	(Maugel et al., 2010)
<i>Raspailia sp</i>	Antibacteriana		<i>Nosyberkol</i>	(Rudi et al., 2004)
<i>Agelas sp</i>	Antibacteriana Antifúngica Antimalárica Citotóxica		<i>Agelasines C</i>	(H. Zhang et al., 2017)
<i>Alomia myriadenia</i>	Anti tumoral Anti-inflamatória		<i>Ent-8S,12S-epoxy-7R,16-dihydroxyhalima-5</i>	(Scio E, Ribeiro A, Alves TM, Romanha AJ, Dias de Souza Filho J, Cordell GA, 2003)
<i>Nardophyllum bryoides</i>	Citotóxico		<i>3a-hydroxy-5,10-didehydrochiliolide</i>	(Sánchez M, Mazzuca M, Veloso MJ, Fernández LR, Siless G, Puricelli L, 2010)

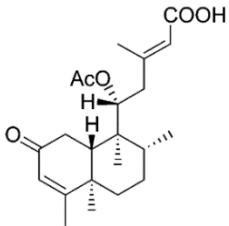
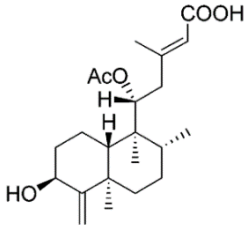
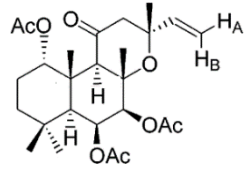
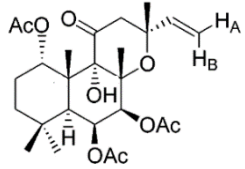
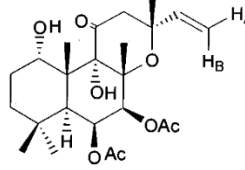
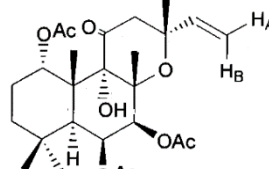
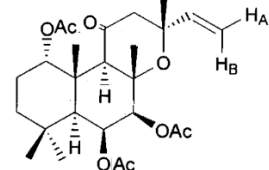
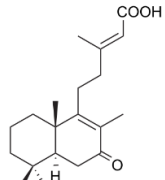
<i>Croton crassifolius</i>	Atividade anti-angiogénica Antiviral		<i>Crassifolin F</i>	(J. J. Wang et al., 2016)
<i>Vitex trifolia</i>	Inibidor da topoisomerase I		<i>13-hydroxy-5(10),14-halimadien-6-one</i>	(Luo et al., 2017)
<i>Micromonospora sp.</i>	Antibacteriano		<i>13-hydroxy-5(10),14-halimadien-6-one</i>	(Y. Zhang et al., 2016)
<i>Vitex rotundifolia</i>	Anti-dislipidémica		<i>Viterofolin I</i>	(W. qiong Wang, Yin, Jun, & Xuan, 2018)
<i>Aparisthium cordatum</i>	Anti-ulcerogénica		<i>Aparisthman</i>	(Hiruma-Lima et al., 2001)
<i>Baccharis salicifolia</i>	Alelopático		<i>Salicifolic acid</i>	(Del Corral, Cuffini, Cardoso, Bortoluzzid, & Palacios, 2012)
<i>Tessmannia densiflora</i>	Repelente		<i>Tessmannic acid</i>	(Kihampa et al., 2009)

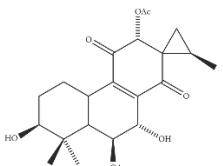
***Plectranthus ornatus* Codd.**

O género *Plectranthus* L'Herit, pertencente à família *Lamiaceae*, é constituída por mais de 300 espécies distribuídas pelos continentes africano e asiático e também na Austrália. Várias espécies de *Plectranthus* são cultivadas para fins decorativos, para obtenção de óleos essenciais, mas também como alimento ou aromatizante. As plantas deste género são utilizadas para o tratamento de dores de cabeça, feridas, queimaduras, dermatites, náuseas e picadas de escorpiões. A *Plectranthus ornatus* Codd. é uma erva suculenta perene, de aroma desagradável, que cresce sobre rochas, em semi-sombra, entre a Etiópia e Tanzânia, e é muito cultivada na África do Sul. (Ascensão, Mota, & Castro, 1999) Na Tabela 5 encontram-se os compostos isolados a partir do extrato desta planta.

Tabela 5-Compostos isolados de *Plectranthus ornatus* (Revisão bibliográfica na Base de dados Pubmed, sem data, usando as palavras-chave: *Plectranthus*; *ornatus*)

	plectornatin A	(Rijo et al., 2002)
	plectornatin B	
	plectornatin C	
	11R*-Acetoxynocleroda-3,13E-dien-15-oic acid (11R*- acetoxylavenic acid)	(Oliveira et al., 2005)

	11R*-Acetoxy-2-oxo-neocleroda-3,13E-dien-15-oic acid (11R*-acetoxy-2-oxokolavenic acid)	
	11R*-Acetoxy-3?-hydroxyneocleroda-4(18),13E-dien-15-oic acid (3):	
	1r,6?,7?-Triacetoxy-8,13R*-epoxy-14-labden-11-one	
	1r,6?,7?-Triacetoxy-9-hydroxy-8,13R*-epoxy-14-labden-11-one	
	6-O-acetylforskolin	(Rijo, Simões, & Rodríguez, 2005)
	1,6-di-O-acetylforskolin	
	1,6-di-O-acetyl-9-deoxyforskolin	
	rhinocerotoic acid 1	(Rijo, Gaspar-Marques, Simões, Jimeno, & Rodríguez, 2007)

	3β-hidroxi-3-desoxicbarbatusin	(Goretti et al., 2017)
---	--------------------------------	------------------------

Capítulo I: Parte experimental

1. Material

1.1 Reagentes

Os reagentes usados nas extrações e isolamento (acetona, *n*-hexano, acetato de etilo, *n*-pentano, metanol, diclorometano) foram previamente destilados.

Para o HPLC foram utilizados acetonitrilo (ACN), metanol e ácido trifluoacético (TFA) a 0,3% (m/m) (VWR), de elevada pureza e próprios para HPLC.

A cromatografia em camada fina (TLC) foi realizada em folhas de alumínio revestidas de Sílica gel 60 PF 254 (Merck). Para o estudo dos eluentes de HPLC foram utilizadas folhas de TLC em alumínio revestidas de sílica gel 60 RP-18F254S.

No fracionamento em coluna, foi utilizada sílica gel 60 (granulometria 0,040-0,063 mm, Merck). Para as colunas secas foi utilizada sílica gel 60 (granulometria 0,063-0,200mm, Merk).

A revelação das placas de sílica foi feita através da sua pulverização com uma mistura de ácido sulfúrico/metanol (50:50) e sob aquecimento.

As amostras 20 µL foram analisadas utilizando um gradiente de acordo com a tabela 6 a um fluxo de solvente de 1 ml/min.

Tabela 6-Gradiente utilizado para a detecção do composto **Hal**, por HPLC

Tempo (min.)	Eluentes		
	Metanol	ACN	TFA (0,3%)
0	15%	5%	80%
20	10%	80%	10%
28	15%	5%	80%

1.2. Equipamento

Evaporador rotativo (K Ika-WERKE, GMBH CO.KG; D-79219 Staufen), Aparelho de ultrassons da VWR, Filtros Whatman papel N° 5 (Whatman, Inc.), HPLC-DAD (Agilente 1260 Infinity,), lâmpada de UV/visível (Camag 1216), balança (Kern 770)

1.3. Material vegetal

A planta medicinal, *Plectranthus ornatus* Codd., proveniente da África do Sul foi cultivada no Instituto Superior de Agronomia (Lisboa, Portugal). A designação da planta foi verificada em www.theplantlist.org. Os espécimes voucher foram identificados por Eurico. S. Martins e depositados no Herbário do “Instituto de Investigação Científica Tropical”, em Lisboa (ref. C. Marques S / N° LISC).

2. Métodos

Os extratos são misturas complexas de substâncias com diferentes polaridades e hidrofobicidades. A preparação de amostras na investigação da composição de extratos inclui pelo menos três etapas:

1. Homogeneização da matéria a extrair, os métodos mais comuns para este efeito são a secagem, liofilização ou destilação a vapor.
2. Extração de componentes a analisar com solvente(s) adequado(s)
3. Purificação do analito a partir do extrato obtido.

2.1. Preparação de extratos e rendimento de extração

A planta da espécie *P.ornatus* foi colhida e identificada. A planta inteira foi pulverizada (**a**-Figura 8) e uma massa de 1,261 Kg foi dividida em fracções e colocada em acetona (volume total de solvente gasto de 13 L) e submetida a ultra-sons durante meia-hora, temperatura ambiente (**b**-Figura 8). A solução foi evaporada num evaporador rotativo, obtendo-se um extrato seco de 89,30g (**c**-Figura 8). O rendimento de extração foi de 7,082 % (m/m), calculado pela fórmula descrita na figura 7.

$$\eta = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{planta}}} \times 100 \Leftrightarrow \eta = 7,082 \% (m/m)$$

Figura 7- Cálculo do rendimento de extração

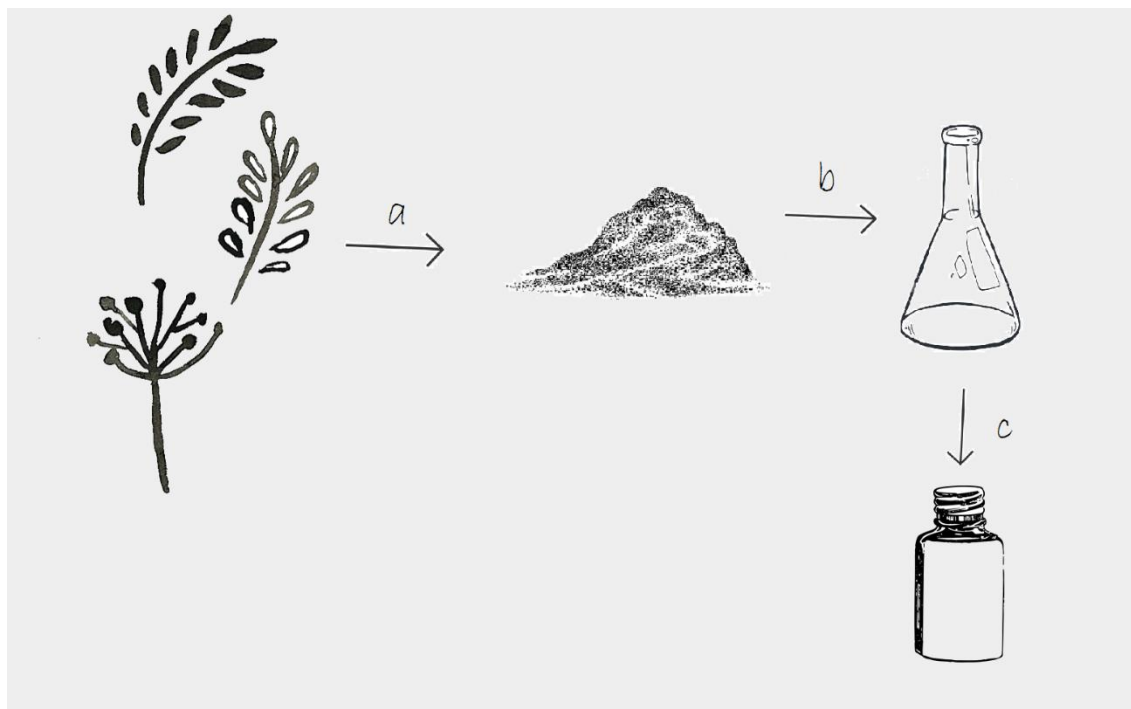


Figura 8-Esquema do procedimento de extração

2.2. Fraccionamento e Isolamento

Dos 89,30g de extrato obtidos realizaram-se 3 separações cromatográficas. A primeira coluna efectuada foi do tipo flash (Coluna 1A) de onde se obtiveram 14 frações. A eluição foi em gradiente de polaridade, começando a *n*-hexano 100% e aumentando (de 1% em 1%) a concentração de acetato de etilo, até este atingir os 100%.

Ainda a partir do extrato inicial, realizaram-se mais duas colunas secas, 2A e 3A (4g e 10g de extrato respectivamente) tendo-se obtido 4 frações de cada uma delas.

A partir da junção das frações 13 e 14 da coluna 1A e a fracção 1 da coluna 3A (massa total aplicada de 26,463g), obtiveram-se 4 frações, numa coluna seca designada com 1B.

A fracção 12 (18,4075 g de massa) da coluna 1A foi novamente separada numa coluna seca (Coluna 2B), com obtenção de 5 fracções.

As frações 5,6,9,10 e 11 da Coluna 1A foram unidas (total de massa de 3,5807g) e o resíduo foi recromatografado, em uma coluna seca (Coluna C). Nesta coluna foram distinguidas 5 frações.

Todas estas frações foram distinguidas por TLC de fase móvel diclorometano:acetona (95:5). Estes procedimentos encontram-se sumarizados na figura 9.

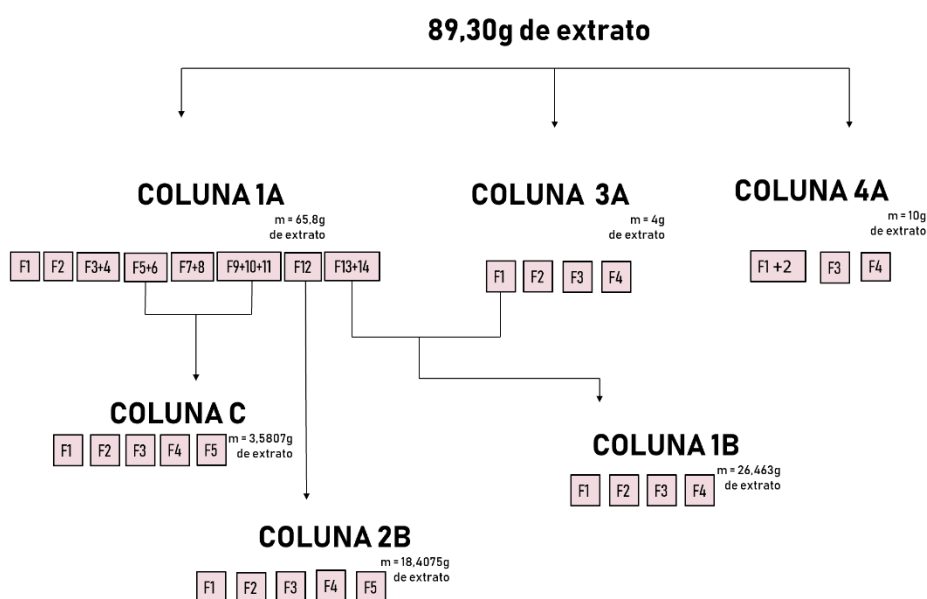


Figura 9- Esquema das cromatografias realizadas

2.3. Recristalização

A recristalização do composto **Hal** puro em *n*-pentano e acetato de etilo foi efetuada em por lavagem da fracção 4 proveniente da coluna C como descrito na literatura. (Rijo et al., 2007)

2.4. Identificação

A identificação foi realizada HPLC por comparação com um padrão (amostra autêntica) proveniente de um grupo que caracterizou este composto por RMN (Rijo et al., 2007). Os espectros de absorção obtidos (amostra e padrão) encontram-se nas figuras 11 e 12.

O HPLC é uma técnica versátil, robusta e amplamente utilizada para o isolamento e identificação de compostos. A sua rapidez e o poder de resolução permitem detectar e validar a presença de um composto numa mistura complexa mesmo em pequenas quantidades. O HPLC utilizado é formado por módulos: uma bomba de distribuição de solvente, um auto-sampler e injector, uma pré-coluna, uma coluna analítica e um detector (figura 10). (Duistermaat & Kolk, 2011)

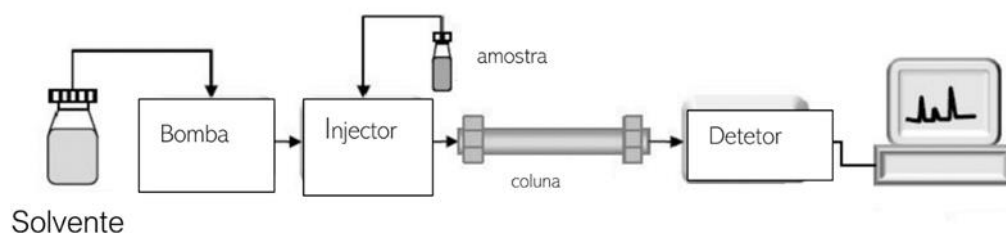


Figura 10- Esquema de um aparelho de HPLC

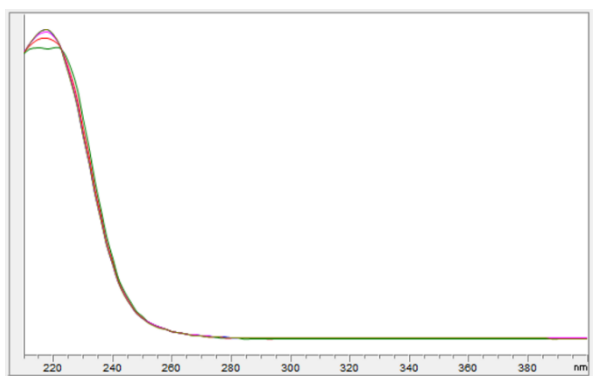


Figura 11- Espectro de absorção da amostra autêntica.

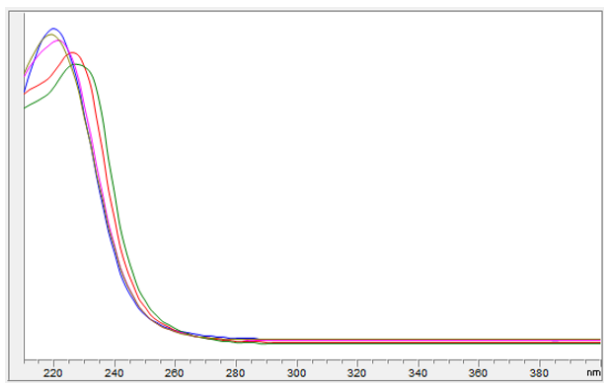


Figura 12- Espectro de absorção da amostra

Capítulo II: Resultados e Discussão

1.Extração

Neste trabalho foi realizada a extracção da planta inteira de *P. ornatus*, por um método de extração por ultra-sons obtendo-se 89,30 g de extrato seco com um rendimento de extracção de 7,082% (m/m). Em estudos anteriores desta planta onde foi realizada uma maceração, o rendimento foi de 5,412% (m/m) (Rijo et al., 2002). Comparando os dois rendimentos pode-se concluir que método de ultra-sons é mais eficaz que a maceração para esta planta. A extração por maceração é muito simples, mas exige muito tempo para pouca eficiência de extração elevada quantidade de solvente. A extração assistida por ultrassom, usa energia de ondas ultra-sónicas na extração. Estas ondas provocam cavitação do solvente o que acelera a dissolução e a difusão do solvente, o que melhora a eficiência da extração. Outras vantagens incluem: baixo consumo de solvente e energia, reduzido tempo de extração. Tanto a maceração como o ultrassons podem ser usados para a extração de componentes termolábeis.(Zhang, Lin, & Ye, 2018)

Neste trabalho o solvente utilizado foi a acetona. Dois solventes estão descritos para extratos por maceração de *P.ornatus*, acetona com um rendimento de 5,412% (m/m) (Rijo et al., 2002) e *n*-hexano com um rendimento de 1%(m/m) (Oliveira et al., 2005). Tendo em conta estes dados pode concluir-se que a acetona produz melhores resultados em extrações desta planta.

2. Isolamento

Neste trabalho o isolamento de **Hal** foi efectuado de acordo com o esquema da figura 13. Após a obtenção do extrato (A) o passo seguinte é a separação do mesmo em várias frações diferentes constituídas por compostos de polaridades semelhantes. O fracionamento inicial de qualquer extrato bruto não deve originar demasiadas frações, com o objectivo de não dispersar o composto alvo produzindo fracções com concentração de tal maneira baixa em analito que se torne difícil a sua detecção. (Duistermaat & Kolk, 2011) Foi esse o objectivo da coluna flash (B), fraccionar para obter misturas menos complexas para se proceder ao isolamento mais eficaz.

Um isolamento por coluna seca sob vácuo (C), feito a partir de uma fracção da coluna flash anterior foi suficiente para obter uma fracção de composto **Hal** muito limpa e pronta a recrystalizar (D).

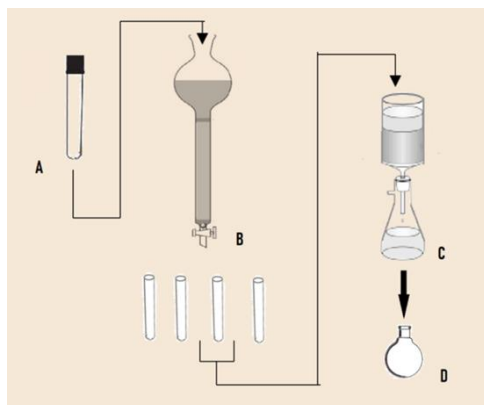


Figura 13-Procedimento para obtenção da amostra

A escolha da fase estacionária depende da polaridade do analito. Dentro das várias classes de compostos consultou-se a bibliografia publicada como ponto de partida. Para *P.ornatus* dois sistemas de eluentes foram utilizados *n*-hexano-acetato de etilo (Oliveira et al., 2005) e petróleo-acetato de etilo (Rijo et al., 2002). Por razões económicas e pela semelhança entre os dois sistemas de solventes, escolheu-se a segunda mistura de eluentes (*n*-hexano-acetato de etilo). Pode concluir-se que foi uma boa escolha para extrair o composto **Hal**, visto que ao final de duas colunas obteve-se uma fracção com grande quantidade deste composto.

3. Recristalização

A recristalização pode servir como processo de purificação e para produzir cristais para determinação da estrutura molecular. (Sarker, Latif, & Gray, 2006) Foi realizada de acordo com a literatura. Os solventes utilizados foram o *n*-pentano e acetato de etilo foi efetuada na fracção 4, proveniente da coluna C.

4. Identificação por comparação com amostra autêntica

A identificação foi realizada por HPLC em comparação com uma amostra autêntica proveniente do grupo que caracterizou este composto por RMN. Esta autentificação foi realizada por comparação dos espectros de absorção do padrão e amostra, que se mostraram idênticos.

Conclusão

A TB, apesar de ter tratamento, continua a matar milhares de pessoas todos os anos. O *Mtb* é a bactéria causadora desta doença, uma bactéria com milhares de anos de evolução que se traduziram em mutações que permitem não só evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro, como sobreviver dentro dele sem criar sintomas (dificultando o diagnóstico e com maior probabilidade de propagação). Para além disso, é possuidor de uma aptidão notável para criar resistência a AB com mais de 600 000 novos casos com resistência AB de 1ª linha em apenas duas décadas. Esta estirpe leva a um prognóstico muitas vezes fatal, e com possibilidade de infecção de mais doentes se não for reconhecida a tempo.(Evangelopoulos et al., 2010)

O tratamento é moroso (6 meses) e repleto de efeitos secundários custosos para o doente (neuropatia periférica, sintomas gastrointestinais, toxicidade hepática e sintomas neurológicos) que afectam a adesão à terapêutica outro fator que conduz ao aparecimento de casos de TB multirresistente.(Gupta et al., 2017; L.Daley, 2016)

No século passado, a comunidade científica apercebeu-se da alta diversidade estrutural que ocorre nos PN. A sua eficácia está relacionada com a complexidade das suas propriedades químicas e organização estérica, que permitem elevada eficiência e seletividade para alvos moleculares (Yuan, Ma, Ye, & Piao, 2016). Como um exemplo bem-sucedido de desenvolvimento de fármacos a partir de PN, a artemisinina, um antimalárico de origem natural, que valeu a Dra. Youyou Tu, farmacêutica, o Prémio Nobel da Medicina e Fisiologia, em 2015, depois de salvar milhares de vidas, com os seus estudos sobre este composto (Guo, 2016).

Com base nestes estudos, efectuou-se nova extração acetónica assistida por ultra-sons (rendimento de extração 7,082% (m/m)) e o isolamento cromatográfico de 5,3 mg de composto de diterpeno de esqueleto halimano no seu estado puro. A presença deste composto foi confirmada por HPLC-DAD, por comparação com o espectro de uma amostra autêntica. Pretende-se no futuro o isolamento total do composto neste extrato que será utilizado em novos estudos biológicos para ser usado como tuberculostáticos.

Bibliografia

- Andrade, J. M., Custódio, L., Romagnoli, etc. (2018). Antitubercular and anti-inflammatory properties screening of natural products from *Plectranthus* species. *Future Medicinal Chemistry*, 10(14), 1677–1691. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0043>
- Andrade, J. M., Rijo, P., Díaz-Lanza, A., etc. (2018). Anti-mycobacterial activity of labdane and halimane diterpenes obtained from *Plectranthus ornatus* Codd. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 15(1), 101–110. <https://doi.org/10.19277/bbr.15.1.179>
- Aro, A. O., Dzoyem, J. P., Awouafack, etc. (2019). *Fractions and isolated compounds from Oxyanthus speciosus subsp . stenocarpus (Rubiaceae) have promising antimycobacterial and intracellular activity.* 1–11.
- Ascensão, L., Mota, L., & Castro, M. D. M. (1999). Glandular trichomes on the leaves and flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, distribution and histochemistry. *Annals of Botany*, 84(4), 437–447. <https://doi.org/10.1006/anbo.1999.0937>
- Buter, J., Heijnen, D., Wan, I. C., Bickelhaupt, etc. (2017). Stereoselective Synthesis of 1-Tuberculosinyl Adenosine; a Virulence Factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Org Chem.*, 263(2), 219–227. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000001177>.Complications
- Chaipukdee, N., Kanokmedhakul, K., Kanokmedhakul, S., Lekphrom, R., & Pyne, S. G. (2016). Fitoterapia Two new bioactive iridoids from *Rothmannia wittii*. *Fitoterapia*, 113, 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.07.007>
- Chan, H.-C., Feng, X., Ko, T.-P., Chun-Hsiang, Hu, Y., etc. (2014). Structure and Inhibition of Tuberculosinol Synthase and Decaprenyl Diphosphate Synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of the American Chemical Society*, 136(7), 2892–2896. <https://doi.org/10.1021/ja413127v>
- Chen, H., Zhao, Z., Li, Z., Huang, Y., etc. (2018). *Anti-Proliferative and Anti-Inflammatory Lanostane Triterpenoids from the Polish Edible Mushroom Macrolepiota procera.* <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00287>
- Chevalier, F. Le, Cascioferro, A., Majlessi, L., Herrmann, J. L., & Brosch, R. (2014). *Mycobacterium tuberculosis* evolutionary pathogenesis and its putative impact on drug development. *Future Microbiology*, 9(8), 969–985. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.70>
- De Souza, M. V. N. (2005). *Plants and Fungal Products with Activity Against*

- Tuberculosis. *The Scientific World JOURNAL*, 5, 609–628.
<https://doi.org/10.1100/tsw.2005.80>
- Del Corral, S., Cuffini, S. L., Cardoso, S. G., Bortoluzzid, A. J., & Palacios, S. M. (2012). Phytotoxic halimanes isolated from *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pad.) Pers. *Phytochemistry Letters*, 5(2), 280–283.
<https://doi.org/10.1016/j.phytol.2012.02.001>
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303–336.
<https://doi.org/10.3390/metabo2020303>
- Evangelopoulos, D., Plazas, E. A., Guzman, J. D., Gupta, A., Bhakta, S., Cuca, L. E., ... Basavannacharya, C. (2010). Anti-tubercular screening of natural products from Colombian plants: 3-methoxynordomesticine, an inhibitor of MurE ligase of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(10), 2101–2107. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq313>
- Farah, S. I., Abdelrahman, A. A., North, E. J., & Chauhan, H. (2015). Opportunities and Challenges for Natural Products as Novel Antituberculosis Agents. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 14(1), 29–38.
<https://doi.org/10.1089/adt.2015.673>
- Felipe, L. O., & Bicas, J. L. (2017). Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. *Química e Sociedade*, 39(2), 120–130. <https://doi.org/10.21577/0104-8899.20160068>
- Forrellad, M. A., I.Klepp, L., Gioffré, A., García, J. S. y, Morbidoni, H. R., & Bigi, M. de la P. S. A. A. C. & F. (2013). Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4(1), 3–66. <https://doi.org/10.4161/viru.22329>
- Goretti, M., Silva, D. V., Lima, L. B., Ferreira, C., Mattos, M. C. De, & Mafezoli, J. (2017). Quantification of Barbatusin and 3beta-Hydroxy-3-deoxybarbatusin in *Plectranthus* Species by HPLC-DAD. 2017.
- Guo, Z. (2016). Artemisinin anti-malarial drugs in China. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 6(2), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.01.008>
- Gupta, V. K., Kumar, M. M., Bisht, D., & Kaushik, A. (2017). Plants in our combating strategies against *Mycobacterium tuberculosis*: Progress made and obstacles met. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1536–1544.
<https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1309440>
- Hiruma-Lima, C. A., Gracioso, J. S., Toma, W., Almeida, A. B., Paula, A. C., Brasil, D.

- S. B., ... Souza Brito, A. R. M. (2001). Gastroprotective effect of aparisthman, a diterpene isolated from *Aparisthmium cordatum*, on experimental gastric ulcer models in rats and mice. *Phytomedicine*, 8(2), 94–100.
<https://doi.org/10.1078/0944-7113-00017>
- Kihampa, C., Nkunya, M. H. H., Joseph, C. C., Magesa, S. M., Hassanali, A., Heydenreich, M., & Kleinpeter, E. (2009). Anti-mosquito and antimicrobial nor-halimans, isocoumarins and an anilinoide from *Tessmannia densiflora*. *Phytochemistry*, 70(10), 1233–1238.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.024>
- Knechel, N. A. (2009). Tuberculosis: Pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Critical Care Nurse*, 29(2), 34–43. <https://doi.org/10.4037/ccn2009968>
- L.Daley, C. (2016). Treatment. In *Drug-Resistant Tuberculosis: A Survival Guide for Clinicians* (pp. 63–98).
- Lawn, S. D., & Zumla, A. I. (2011). Tuberculosis. *The Lancet*, 378(9785), 57–72.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62173-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62173-3)
- Layre, E., Lee, H. J., Young, D. C., Jezek Martinot, A., Buter, J., Minnaard, A. J., ... Moody, D. B. (2014). Molecular profiling of *Mycobacterium tuberculosis* identifies tuberculosinyl nucleoside products of the virulence-associated enzyme Rv3378c. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(8), 2978–2983.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1315883111>
- Li, H., Webster, D., Johnson, J. A., & Gray, C. A. (2015). Anti-mycobacterial triterpenes from the Canadian medicinal plant *Alnus incana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.042>
- Luo, P., Yu, Q., Liu, S. N., etc (2017). Diterpenoids with diverse scaffolds from *Vitex trifolia* as potential topoisomerase I inhibitor. *Fitoterapia*, 120(May), 108–116.
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2017.06.006>
- Mann. (1987). *Secondary metabolism* (2nd Editio; O. U. Press, Ed.). New York.
- Mann, F. M., Xu, M., Chen, X., Fulton, D. B., Russell, D. G., & Peters, R. J. (2009). Edaxadiene: A New Bioactive Diterpene from *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of the American Chemical Society*, 131(48), 17526–17527.
<https://doi.org/10.1021/ja9019287>
- Maugel, N., Mann, F. M., L.Hilwig, M., Peters, R. J., & Snider, B. B. (2010). *Synthesis of (±)-Nosyberkol (Isotuberculosinol, Revised Structure of Edaxadiene) and (±)-Tuberculosinol*. 71(11), 3831–3840. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10->

4002.BONE

- Nakano, C., & Hoshino, T. (2009). Characterization of the Rv3377c gene product, a type-B diterpene cyclase, from the *Mycobacterium tuberculosis* H37 genome. *ChemBioChem*, 10(12), 2060–2071. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900248>
- Nakano, C., Okamura, T., Sato, T., Dairi, T., & Hoshino, T. (2005). *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv3377c encodes the diterpene cyclase for producing the halimane skeleton. *Chemical Communications*, (8), 1016–1018. <https://doi.org/10.1039/b415346d>
- Oldfield, E. (2015). Tuberculosis Terpene Targets. *Chemistry & Biology*, 22(4), 437–438. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.04.004>
- Oliveira, P. M., Ferreira, A. A., Silveira, D., Alves, R. B., Rodrigues, G. V., Emerenciano, V. P., & Raslan, D. S. (2005). Diterpenoids from the aerial parts of *Plectranthus ornatus*. *Journal of Natural Products*, 68(4), 588–591. <https://doi.org/10.1021/np049827n>
- Orcid, A. H. (2019). *Roles of plant volatiles in defense against microbial pathogens and microbial exploitation of volatiles*. (2019), 0–2. <https://doi.org/10.1111/pce.13602>
- Pethe, K., Swenson, D. L., Alonso, S., Anderson, J., Wang, C., & Russell, D. G. (2004). Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(37), 13642–13647. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401657101>
- Prach, L., Kirby, J., Keasling, J. D., & Alber, T. (2010). Diterpene production in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Journal*, 277(17), 3588–3595. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07767.x>
- Rajachan, O., Kanokmedhakul, K., & Sanmanoch, W. (2016). Phytochemistry Chevalone C analogues and globoscinic acid derivatives from the fungus *Neosartorya spinosa* KKU-1NK1. *Phytochemistry*, 132, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.09.008>
- Rijo, P. (2010a). *Phytochemical Study and Biological Activities of Diterpenes and Derivatives From Plectranthus Species*. Universidade de Lisboa.
- Rijo, P. (2010b). *Universidade de lisboa faculdade de farmácia - phytochemical study and biological activities of diterpenes and derivatives from plectranthus species*.
- Rijo, P., Gaspar-Marques, C., Simões, M. F., Duarte, A., Apreda-Rojas, M. del C., Cano, F. H., & Rodríguez, B. (2002). Neoclerodane and labdane diterpenoids from *Plectranthus ornatus*. *Journal of Natural Products*, 65(10), 1387–1390.

<https://doi.org/10.1021/np020203w>

- Rijo, P., Gaspar-Marques, C., Simões, M. F., Jimeno, M. L., & Rodríguez, B. (2007). Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P. grandidentatus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(4), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2006.10.011>
- Rijo, P., Simões, M. F., Francisco, A. P., etc. (2010). Antimycobacterial metabolites from *Plectranthus*: Royleanone derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Chemistry and Biodiversity*, 7(4), 922–932. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200900099>
- Rijo, P., Simões, M. F., & Rodríguez, B. (2005). Structural and spectral assignment of three forskolin-like diterpenoids isolated from *Plectranthus ornatus*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(7), 595–598. <https://doi.org/10.1002/mrc.1600>
- Roncero, A. M., Tobal, I. E., Moro, R. F., Díez, D., & Marcos, I. S. (2018). Halimane diterpenoids: sources, structures, nomenclature and biological activities. *Natural Product Reports*, 35(9), 955–991. <https://doi.org/10.1039/c8np00016f>
- Rossiter, S. E., Fletcher, M. H., & Wuest, W. M. (2017). Natural Products as Platforms to Overcome Antibiotic Resistance. *Chemical Reviews*, 117(19), 12415–12474. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00283>
- Rudi, A., Akinin, M., Gaydou, E., & Kashman, Y. (2004). *Asmarines I, J, and K and Nosyberkol: Four New Compounds from the Marine Sponge Raspailia sp.* 1932–1935.
- Samad, A., Sultana, Y., Akhter, M., & Aqil, M. (2008). Treatment of Tuberculosis: Use of Active Pharmaceuticals. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 3(1), 34–44. <https://doi.org/10.2174/157489108783413209>
- Sánchez M, Mazzuca M, Veloso MJ, Fernández LR, Siless G, Puricelli L, P. J. (2010). Cytotoxic terpenoids from *Nardophyllum bryoides*. *Phytochemistry*, 71(11–12), 1183–1438. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.04.019>
- Sanna, G., Madeddu, S., Giliberti, G., Ntalli, N. G., Cottiglia, F., Logu, A. De, ... Caboni, P. (2015). *Limonoids from Melia azedarach Fruits as Inhibitors of Flaviviruses and Mycobacterium tuberculosis*. 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141272>
- Sarker, S. D., Latif, Z., & Gray, A. I. (Eds.). (2006). *Natural Products Isolation* (2nd ed.). Totowa: Humana Press Inc.
- Scio E, Ribeiro A, Alves TM, Romanha AJ, Dias de Souza Filho J, Cordell GA, Z. C.

- (2003). Diterpenes from *Alomia myriadenia* (Asteraceae) with cytotoxic and trypanocidal activity. *Phytochemistry*, 64(6), 1125–1131.
- Sharma, D., & Yadav, J. P. (2017). An Overview of Phytotherapeutic Approaches for the Treatment of Tuberculosis. *Medicinal Chemistry*, (March).
<https://doi.org/10.2174/13895575166661605051146>
- Smith, I. (2003). Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence Mycobacterium tuberculosis. *Society*, 16(3), 463–496.
<https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.463>
- Songsri, S., & Nuntawong, N. (2016). Cytotoxic Labdane Diterpenes from *Hedychium ellipticum* Buch.-Ham. ex Sm. *Sineenard*. 8(17), 1–7.
<https://doi.org/10.3390/molecules21060749>
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 103580.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Wang, J. J., Chung, H. Y., Zhang, Y. B., Li, G. Q., Li, Y. L., Huang, W. H., & Wang, G. C. (2016). Diterpenoids from the roots of *Croton crassifolius* and their anti-angiogenic activity. *Phytochemistry*, 122, 270–275.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.12.011>
- Wang, W. qiong, Yin, Y. peng, Jun, L., & Xuan, L. jiang. (2018). Halimane-type diterpenoids from *Vitex rotundifolia* and their anti-hyperlipidemia activities. *Phytochemistry*, 146, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.12.002>
- WHO. (2018). Tuberculosis - Key facts. Retrieved March 13, 2019, from http://www.basel.ru/en/key_facts/
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*, 21(5).
<https://doi.org/10.3390/molecules21050559>
- Zhang, H., Dong, M., Chen, J., Wang, H., Tenney, K., & Crews, P. (2017). Bioactive secondary metabolites from the marine sponge genus *Agelas*. *Marine Drugs*, 15(11). <https://doi.org/10.3390/md15110351>
- Zhang, Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, 13(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

Zhang, Y., Adnani, N., Braun, D. R., Ellis, G. A., Barns, K. J., Parker-Nance, S., ...

Bugni, T. S. (2016). Diterpenoids from a Marine Micromonospora Species. *Journal of Natural Products*, 79(11), 2968–2972.

<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00555.1D>

Zhu, C.-Z., Hu, B.-Y., Liu, etc. Zhang, Z.-D. (2019). *Anti- Mycobacterium tuberculosis Terpenoids from Resina Commiphora*