

JOANA SOFIA FERREIRA DE ALMEIDA

**ATIVIDADE ANTI-MICOBACTERIANA E ESTUDO
ESTRUTURAL DE DITERPENOS DE HALIMANO E
LABDANO OBTIDOS A PARTIR DE *PLECTRANTHUS
ORNATUS* CODD.**

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Rijo

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

Lisboa

2021

JOANA SOFIA FERREIRA DE ALMEIDA

**ATIVIDADE ANTI-MICOBACTERIANA E ESTUDO
ESTRUTURAL DE DITERPENOS DE HALIMANO E
LABDANO OBTIDOS A PARTIR DE *PLECTRANTHUS
ORNATUS* CODD.**

Dissertação defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona de Humanidades e
Tecnologias no dia 24 de março de 2021,
perante o júri, nomeado pelo Despacho de
Nomeações nº 21/2021 de fevereiro de 2021,
com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro
Rodrigues

Arguente: Prof^ª. Doutora Vânia André

Orientadora: Prof^ª. Doutora Patrícia Dias
Rijo

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde

Lisboa

2021

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias pela possibilidade da realização desta Dissertação de Mestrado. Deixo ainda o meu agradecimento, assim como o meu reconhecimento, a todo o corpo docente integrante desta instituição pela maneira como contribuíram para a minha formação.

Quero deixar também o meu enorme apreço e agradecimento à Professora Doutora Patrícia Rijo por ter aceitado orientar a minha dissertação, apoiando-me de forma incansável com toda a sua disponibilidade e dedicação.

À Doutora Vânia André por ter aceitado receber-me no Centro de Química Estrutural - Instituto Superior Técnico e ter sido uma ajuda constante tanto no trabalho laboratorial como na posterior escrita da dissertação.

Ao Doutor Auguste Fernandes do Centro de Química Estrutural - Instituto Superior Técnico pela disponibilidade para analisar o composto em estudo utilizando o FTIR.

Às minhas colegas de curso, Inês Ferreira e Raquel Pereira, com quem trabalhei de forma mais próxima durante a realização da parte laboratorial do trabalho de projeto e ainda durante a dissertação.

À Joana Andrade, com quem colaborei no seu trabalho de doutoramento e que permitiu assim iniciar o meu trabalho de projeto e prosseguir para a minha dissertação.

À Vera Isca pelo apoio e constante ajuda em tudo o que era necessário.

À Jane ja Aatos Erkon säätiö e à Escola de Ciências e Tecnologias da Saúde pelas bolsas que me foram designadas.

Finalmente, quero agradecer à minha família e amigos por todo o apoio e força que me deram ao longo destes anos de curso.

Resumo

Os produtos naturais constituem uma fonte única de compostos protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos. Existem vários relatos de diterpenos isolados de *Plectranthus* spp. com atividade tuberculostática interessante. *P. ornatus* Codd. tem sido utilizado na Medicina Tradicional por exemplo como anti-infecioso em determinadas regiões do Brasil. Em trabalhos anteriores, foi possível isolar em grande quantidade um diterpeno com esqueleto de halimano e outro de esqueleto de labdano de *P. ornatus* Codd. Neste trabalho, avaliou-se a atividade anti-micobacteriana destes compostos com uma estirpe não virulenta de *Mycobacterium smegmatis*, a sua citotoxicidade e a concentração inibitória mínima. Pelo método de ultrassons, foi possível obter um extrato acetónico da planta medicinal *P. ornatus* com um rendimento de 7,08% (m/m). O composto diterpénico de esqueleto de halimano foi isolado a partir desse extrato, obtendo-se 5,3 mg de composto puro. O produto foi novamente recristalizado, sendo possível determinar a sua estrutura através de dados de difração de raios-X em monocristal (SCXRD). A caracterização estrutural foi complementada com espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR) e a estabilidade térmica do composto foi aferida através de microscopia de placa quente (HSM).

Palavras-chave: produtos naturais, *Plectranthus* spp., *P. ornatus* Codd, labdano, halimano

Abstract

Natural products are a unique source of lead compounds for the development of new drugs. There are several reports of isolated diterpenes from *Plectranthus* spp. with interesting tuberculostatic activity. *P. ornatus* Codd. has been used in traditional medicine as an anti-infective in certain regions of Brazil. In previous works, it was possible to isolate a large quantity of halimane and labdane skeletons from *P. ornatus* Codd. In this work, the anti-mycobacterial activity of these compounds was evaluated with a non-virulent strain *Mycobacterium smegmatis*, its cytotoxicity and its minimum inhibitory concentration. Using the ultrasound method, it was possible to obtain an acetonic extract of the entire medicinal plant *P. ornatus* with a yield of 7.082% (w/w). The prototype haliman compound was isolated from this extract, obtaining 5.3 mg of pure compound. The product was recrystallized again, being possible to determine its structure through single crystal X-ray diffraction data (SCXRD). The structural characterization was complemented with Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and the thermal stability of the compound was measured using hot stage microscopy (HSM).

Key words: natural products, *Plectranthus* spp., *P. ornatus* Codd, labdane, halimane

Lista de Publicações

- Andrade, J. M., Romagnoli, A., Almeida, J. F., Ferreira, I. M., Garcia, C., Díaz-Lanza, A., Fimia, G. M., Rijo, P. (2018). Anti-mycobacterial activity of labdane and halimane diterpenes obtained from *Plectranthus ornatus* Codd. In *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 15(1), 101–110. <https://doi.org/10.19277/bbr.15.1.179>
- Faustino, C., Andrade, J. M., Ferreira, I. M., Almeida, J. F., & Rijo, P. (2020). Lead molecules from natural products: Insight into tubercular targets. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 65, pp. 41–84). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817905-5.00002-0>

Apresentações em congresso

- Isca, V., Ntungwe, E., Almeida, J. F., Ferreira, I. M., Pereira, R., Siopa, F., Almeida, J., Saraiva, L., Mori, M., Botta, M., Afonso, C. A. M., Rijo, P. (2019). Molecular docking as a tool to design new royleanone derivatives for colon cancer therapy based on PKC- δ modulation. *Planta Medica*, 85(18), 1493-1494. <https://doi.org/10.1055/s-0039-3399909>
- Isca, V., Ntungwe, E., Almeida, J. F., Ferreira, I. M., Pereira, R., Siopa, F., Almeida, J., Saraiva, L., Mori, M., Botta, M., Afonso, C. A. M., Rijo, P. Molecular docking as a tool to design new royleanone derivatives for colon cancer therapy based on PKC- δ modulation. Poster session presented at: 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA); 2019 Sep 1-5; Innsbruck, Austria.
- Almeida, J. F., Ferreira, I. M., Rijo, P. (2019). Preparation and chromatography analysis of *Plectranthus amboinicus* extracts. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 16(2), 16. <https://doi.org/10.19277/bbr.16.2.216>
- Almeida, J. F., Ferreira, I. M., Rijo, P. Preparation and chromatography analysis of

Plectranthus amboinicus extracts. Poster session presented at: Fascination of Plants Day; 2019 May 18; Lisboa, Portugal.

Ferreira, I. M., Almeida, J. F., Rijo, P. (2019). Research of antioxidant and antimicrobial activity of *Plectranthus* extracts. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 16(2), 17. <https://doi.org/10.19277/bbr.16.2.216>

Ferreira, I. M., Almeida, J. F., Rijo, P. Research of antioxidant and antimicrobial activity of *Plectranthus* extracts. Poster session presented at: Fascination of Plants Day; 2019 May 18; Lisboa, Portugal.

Lista de Abreviaturas

TB Tuberculose	InhA Enoil-acil redutase
Mtb Bacilo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	EthA Monooxygenase
HIV Vírus da imunodeficiência humana	Cs Cicloserina
OMS Organização Mundial da Saúde	Trd Trazodona
CDC Centro de Controlo e Prevenção de Doenças	Lzd Linezolida
MDR-TB TB multirresistente	Cfz Clofazimina
XDR-TB TB excessivamente resistente a medicamentos	ROS Espécies reativas de oxigénio
FDA <i>Food and Drug Administration</i>	Z Pirazinamida
EMA Agência Europeia do Medicamento	PncA Pirazinamidase
Lfx Levofloxacina	FAS Sintase de ácidos gordos
Mfx Moxifloxacina	PanD Aspartato descarboxilase
Gfx Gatifloxacina	E Etambutol
Cm Capreomicina	H Isoniazida em altas doses
Am Amicacina	KatG Catalase/peroxidase
Km Canamicina	Bdq Bedaquilina
S Estreptomicina	Dlm Delamanid
Eto Etionamida	Ddn Nitroredutase
Pto Protionamida	PAS Ácido para-aminosalicílico
	DHFR Di-hidrofolato redutase
	DHPS Di-hidropteroato-sintase
	DHFS Di-hidrofolato-sintase
	Imp Imipenem

Cln Cilastatina	LDH Lactato desidrogenase
PBPs Proteínas de ligação à penicilina	INT Iodonitrotetrazólio
Mpm Meropenem	SD Desvio padrão
Amx Amoxicilina	SCXRD Difração de raios-X em monocristal
Clv Clavulanato	FTIR Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
T Tioacetazona	IV Infravermelho
CMI Concentração mínima inibitória	HSM Microscopia de placa quente
CMI99 Concentração mínima inibitória em $\geq 99\%$	APIs Ingredientes farmacêuticos ativos
PBS Solução tamponada de fosfatos	DSC Calorimetria diferencial de varrimento
DMSO Dimetil sulfóxido	HPLC Cromatografia líquida de alta resolução
TLC Cromatografia em camada fina	
ADC Albumina-dextrosecatalase	
PBMC Células mononucleares do sangue periférico	

Índice

Índice de tabelas	12
Índice de figuras	13
1. Introdução	14
1.1. Tuberculose	14
1.2. Fármacos em uso clínico no tratamento da TB	15
1.3. Produtos naturais no tratamento da TB	22
1.4. <i>Plectranthus</i> spp.....	23
2. Objetivos	25
3. Materiais e Métodos	26
3.1. Reagentes e materiais	26
3.2. Material vegetal.....	27
3.3. Estirpe microbiana.....	27
3.4. Isolamento dos compostos halimano e labdano	27
3.5. Avaliação citotóxica dos compostos halimano e labdano	28
3.5.1. Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)	28
3.5.2. Ensaio do lactato desidrogenase (LDH)	29
3.5.3. Método de microdiluição para avaliação anti-micobacteriana	30
3.5.4. Análise estatística	30
3.6. Extração do composto halimano	31
3.7. Isolamento do composto halimano.....	31
3.8. Recristalização do composto halimano	37
3.9. Estudos estruturais do composto halimano	38
3.9.1. Análise microscópica e recristalização	38

3.9.2. Difração de raios-X em monocristal (SCXRD).....	38
3.9.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	39
3.9.4. Análise de microscopia de placa quente (HSM)	40
4. Resultados e Discussão	42
4.1. Atividade anti-micobacteriana dos compostos halimano e labdano	42
4.2. Extração e isolamento do composto halimano	44
4.3. Recristalização do composto halimano	45
4.4. Estudos estruturais do composto halimano	45
5. Conclusão.....	50
Referências bibliográficas	52

Índice de tabelas

Tabela 1. Classificação dos fármacos anti-TB recomendados para o tratamento da TB resistente a rifampicina e da MDR-TB, de acordo com as novas diretrizes da OMS.....	18
Tabela 2. Coluna cromatográfica A1 do extrato de <i>P. ornatus</i>	32
Tabela 3. Colunas cromatográficas A2 e A3 do extrato de <i>P. ornatus</i>	33
Tabela 4. Coluna cromatográfica B1 do extrato de <i>P. ornatus</i>	34
Tabela 5. Coluna cromatográfica B2 do extrato de <i>P. ornatus</i>	34
Tabela 6. Coluna cromatográfica C do extrato de <i>P. ornatus</i>	35
Tabela 7. Ensaio de citotoxicidade LDH para os diterpenos halimano (1) e labdanos (2) isolados de <i>P. ornatus</i> , testados com os valores de MIC. Os dados são expressos como mediana $\pm$ desvio padrão (n = 3); *** p <0,0001. Para a atribuição química do número composto, consultar a Figura 2.	42
Tabela 8. Valores de CMI dos compostos 1-3 isolados de <i>P. ornatus</i> , obtidos pelo método de microdiluição contra <i>M. smegmatis</i> . A rifampicina foi usada como controlo positivo. Os valores de CMI foram tomados como a menor concentração do composto que inibiu $\geq 99\%$ do crescimento do microrganismo após 24 horas de incubação a 37 °C e encontram-se apresentados em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	43
Tabela 9. Parâmetros cristalográficos obtidos por SCXRD e refinamento da estrutura do composto.....	47

Índice de figuras

Figura 1. Medicamentos padrão de primeira linha usados no tratamento da TB.	16
Figura 2. Diterpenos de halimano (1) e labdano (2-3) isolados de <i>Plectranthus ornatus</i> , em estudo.	28
Figura 3. Equipamento de SCXRD.....	39
Figura 4. Equipamento de FTIR.	40
Figura 5. Equipamento de HSM.	41
Figura 6. Cristais de halimano observados ao microscópio após segunda recristalização.	45
Figura 7. Estrutura do halimano obtida por SCXRD (elipsóides definidos a 30% de probabilidade) (a); Representação do sintão R22(8) , com as respectivas pontes de hidrogénio representadas a azul (b); Empacotamento supramolecular, visto ao longo de <i>a</i> (c).	46
Figura 8. Análise do halimano por FTIR.	48
Figura 9. Análise do halimano por HSM.	49

1. Introdução

1.1. Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que se transmite principalmente através de gotículas provenientes da tosse. Esta doença é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. (Faustino, Andrade, Ferreira, Almeida, & Rijo, 2020)

O Mtb classifica-se como uma bactéria Gram-positivo fraca, tendo sido identificada pela primeira vez em 1882 por Robert Koch. (Faustino et al., 2020)

Após contacto com o bacilo, o sistema imunitário pode eliminar a infeção (o que ocorre em 50 a 75% dos pacientes) e assim que a resposta imune mediada por células é ativada, a replicação bacteriana consegue ser geralmente controlada em 90 a 95% dos casos, apresentando sinais não evidentes ou com sintomas correspondentes à TB latente. (Faustino et al., 2020)

O Mtb conseguiu desenvolver elaborados mecanismos de sobrevivência em humanos, permitindo assim a sua permanência num estado de infeção latente, envolvendo constantemente o sistema imunitário e com possibilidade de progredir para doença ativa (5 a 10% dos pacientes). Todavia, a probabilidade de desenvolver TB é superior quando o paciente já apresenta outras patologias, como é o caso do vírus da imunodeficiência humana (HIV) ou diabetes. É ainda importante referir que o aumento de probabilidade de desenvolver esta doença infecciosa também se encontra relacionado com outros fatores, como é o caso do tabagismo, abuso de álcool e desnutrição. (Faustino et al., 2020)

Embora ainda não seja completamente possível compreender os mecanismos utilizados pelo Mtb para se relacionar com a célula hospedeira e controlar as defesas do hospedeiro, o que permite espalhar os macrófagos alveolares para outros tecidos e órgãos, já foram realizados alguns estudos com a estirpe patogénica H37Rv que revelaram que para ocorrer uma infeção bem-sucedida, o agente patogénico deve utilizar os macrófagos para realizar a sua replicação e que estes se devem manter viáveis. (Faustino et al., 2020)

Consoante a literatura, o Mtb possui várias estratégias de sobrevivência, entre as quais: inibição da fusão fagossoma-lisossoma; inibição da acidificação do fagossoma; recrutamento e retenção da proteína de revestimento, contendo triptofano-aspartato, em fagossomas para impedir a sua entrega aos lisossomas; e expressão de membros da família de proteínas repetitivas ricas em glicina e induzidas pelo hospedeiro. (Faustino et al., 2020)

1.2. Fármacos em uso clínico no tratamento da TB

Segundo o Relatório Global de Tuberculose da Organização Mundial da Saúde (OMS) de 2018, a taxa de mortalidade por TB diminuiu cerca de 29% desde 2000 mas esta patologia continua a ser uma preocupação global de saúde pública pois existem ainda 10 milhões de novos casos anuais de TB ativa com cerca de 1,3 milhões de mortes. Para além destes valores, estima-se que cerca de 1,7 mil milhões de pessoas (aproximadamente 23% da população mundial) possuam uma infeção latente por TB. (Faustino et al., 2020)

O tratamento desta patologia é complexo e envolve vários fármacos de forma a prevenir recaídas assim como o desenvolvimento de estirpes resistentes. (Faustino et al., 2020)

O regime padrão para a TB suscetível a fármacos inclui uma fase intensiva e uma fase de consolidação da “esterilização”. A primeira tem uma duração de 2 meses para que se dê uma redução da carga bacteriana, exigindo 4 medicamentos orais anti-TB de primeira linha: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (**Figura 1**). A segunda dura 4 meses e utiliza apenas a rifampicina e a isoniazida. (Faustino et al., 2020)

Considerada anteriormente como um fármaco de primeira linha, a estreptomicina já não é usada de forma rotineira devido ao aparecimento de estirpes resistentes a este fármaco. (Faustino et al., 2020)

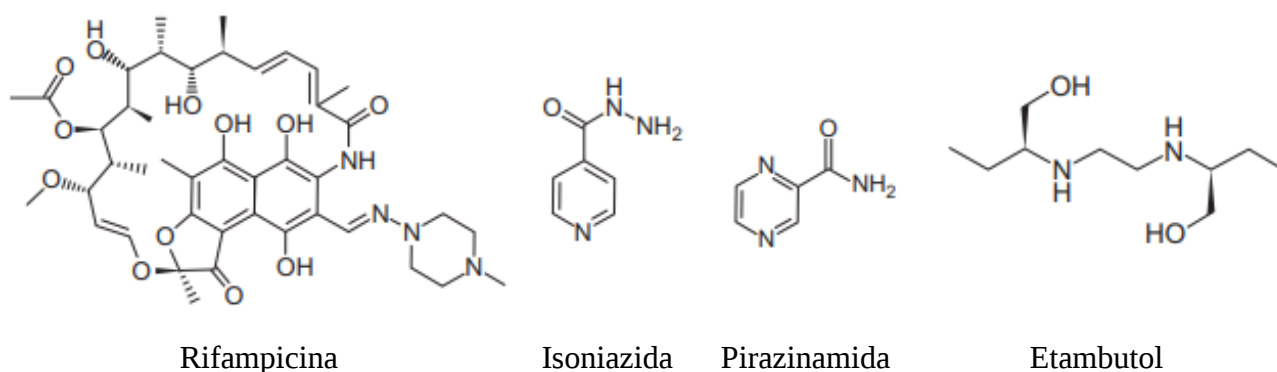


Figura 1. Medicamentos padrão de primeira linha usados no tratamento da TB.

(Adaptado de (Faustino et al., 2020))

Relativamente ao tratamento da TB resistente, este é mais demorado pois requer fármacos de segunda linha que além de serem mais caros, possuem um período de tratamento geralmente superior a 20 meses e são ainda caracterizados por possuírem menor eficácia e uma maior taxa de efeitos adversos tóxicos. Nestes fármacos incluem-se agentes bactericidas injetáveis (ex. amicacina), fluoroquinolonas com atividade bactericida e esterilizante (ex. levofloxacina) e ainda fármacos bacteriostáticos orais (ex. cicloserina). (Faustino et al., 2020)

Em muitos dos casos, existe uma baixa adesão à terapêutica por parte do paciente, associada à falha do tratamento e ao desenvolvimento de resistência da TB aos fármacos utilizados. De acordo com a OMS e o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC), existem diferentes categorias de resistência: TB resistente causada pela resistência do Mtb a pelo menos um fármaco anti-TB de primeira linha; TB multirresistente (MDR-TB) que ocorre quando o Mtb se torna resistente a isoniazida e rifampicina; e TB excessivamente resistente a medicamentos (XDR-TB). Esta última categoria diz respeito a um tipo raro de MDR-TB que demonstra resistência adicional a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos um dos fármacos injetáveis de segunda linha (ex. amicacina). A nível mundial, apenas cerca de 50% dos pacientes com MDR-TB foram tratados com sucesso já que existe uma elevada taxa de mortalidade e ainda perda de seguimento clínico nestes casos. (Faustino et al., 2020)

Com o aumento da prevalência global de TB resistente a fármacos nos últimos anos, tornou-se necessário proceder a uma reavaliação de vários antibióticos e antiparasitários. Além disso, houve um aumento na procura de novos fármacos anti-TB que possuissem novos

mecanismos de ação. Assim, a clofazimina (fármaco antileproso), a linezolida (antibiótico) e os antibióticos carbapenémicos foram recentemente designados como medicamentos de segunda linha para o tratamento da MDR-TB. (Faustino et al., 2020)

Atualmente, o medicamento Sirturo®, comercializado desde dezembro de 2012, é o novo fármaco indicado para o tratamento da MDR-TB. O seu princípio ativo é a bedaquilina, uma diarilquinolina, que possui um novo mecanismo de ação descoberto 40 anos depois da última aprovação de um medicamento para a TB. (Faustino et al., 2020)

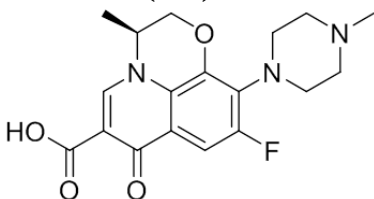
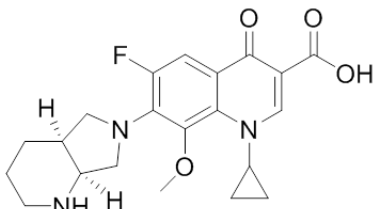
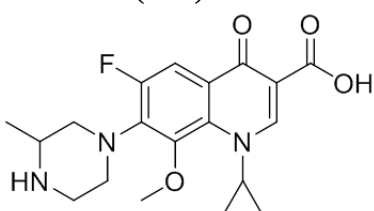
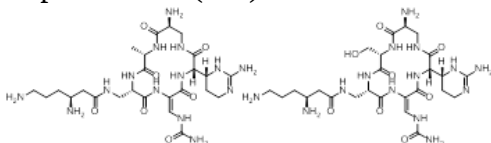
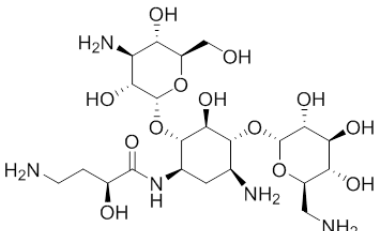
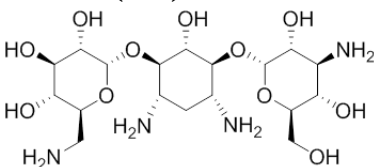
Após a aprovação deste fármaco pela *Food and Drug Administration* (FDA), foi introduzido no mercado um outro novo medicamento anti-TB. O Deltyba possui como princípio ativo o delamanid, um nitroimidazol aprovado em 2014 pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) para o tratamento da MDR-TB. Este medicamento foi introduzido na Índia em 2017 e na China em 2018. (Faustino et al., 2020)

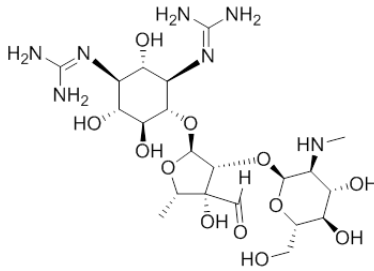
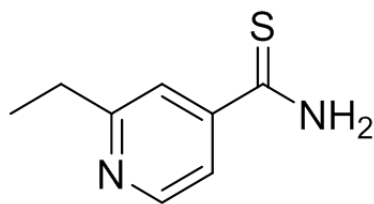
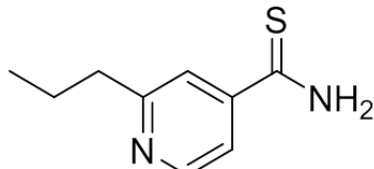
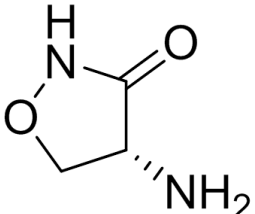
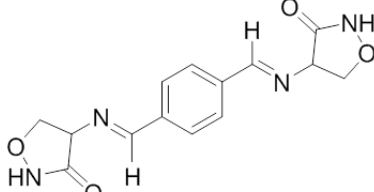
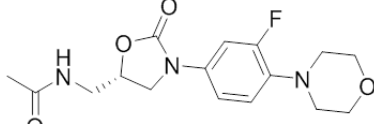
Contudo, estes novos agentes terapêuticos têm sido associados a graves efeitos secundários como é o caso da disfunção cardíaca e hepática. (Faustino et al., 2020)

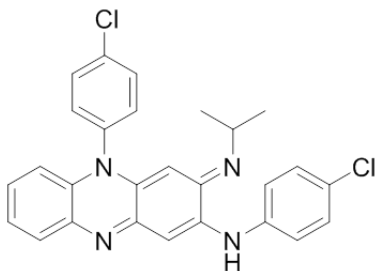
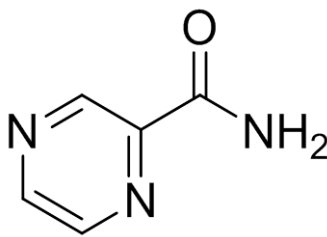
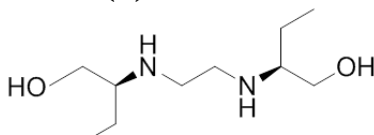
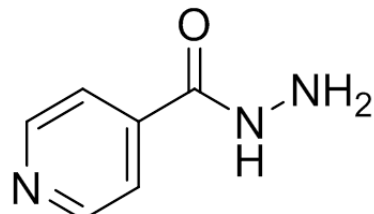
Em 2016, a classificação da OMS relativamente aos fármacos indicados contra a MDR-TB sofreu uma revisão e de acordo com novas diretrizes (**Tabela 1**), o regime de combinação padrão para pacientes infetados com estirpes resistentes de *Mtb* deve incluir pelo menos cinco fármacos anti-TB eficazes, sendo eles a pirazinamida e quatro fármacos essenciais de segunda linha (um do grupo A, um do grupo B e pelo menos dois do grupo C). Adicionalmente, a pirazinamida pode ainda ser substituída por um fármaco do grupo C ou D, sendo preferencial um do grupo D2. Assim, os medicamentos de primeira linha anti-TB pertencentes ao grupo 1 na classificação anterior, perdem prioridade nesta nova classificação e passam a estar incluídos no grupo D1. (Faustino et al., 2020)

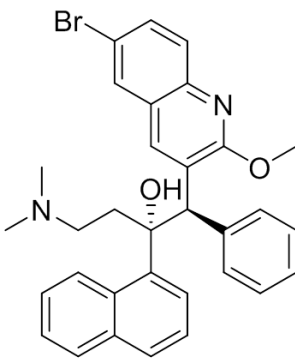
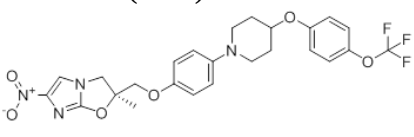
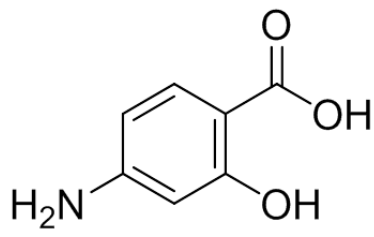
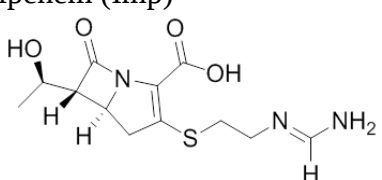
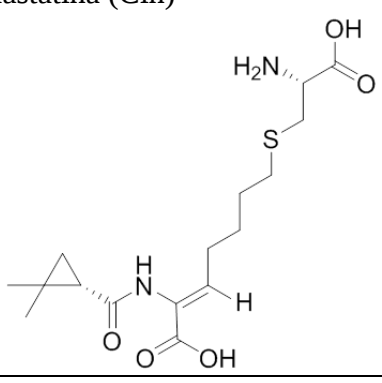
Tabela 1. Classificação dos fármacos anti-TB recomendados para o tratamento da TB resistente a rifampicina e da MDR-TB, de acordo com as novas diretrizes da OMS.

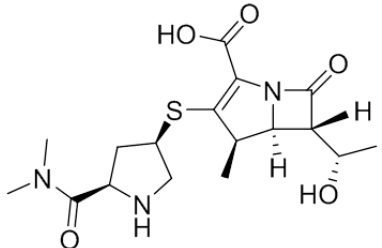
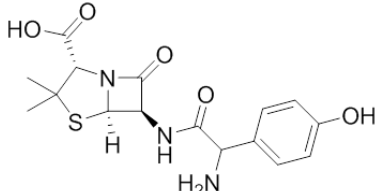
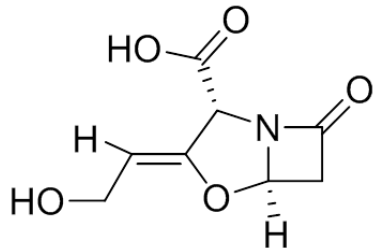
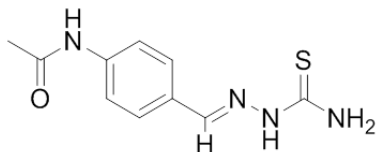
(Adaptado de (Faustino et al., 2020); Estruturas químicas reproduzidas do ChemDraw)

Fármaco (Abreviatura)	Classificação	Mecanismo de ação
Grupo A. Fluoroquinolonas		
Levofloxacin (Lfx) 	Fluoroquinolona	Inibição da replicação do DNA pela ligação às topoisomerasas II (DNA girase) e IV (ausentes nas micobactérias).
Moxifloxacin (Mfx) 		
Gatifloxacin (Gfx) 		
Grupo B. Agentes injetáveis de segunda linha		
Capreomicin (Cm) 	Polipeptídeo	Inibição da síntese proteica com ligação na interface entre as subunidades ribossômicas 30S e 50S.
Amikacin (Am) 	Aminoglicosídeos	Inibição da síntese de proteínas pela ligação à subunidade ribossômica 30S.
Canamicin (Km) 		

Estreptomicina (S) 		
Grupo C. Outros agentes principais de segunda linha		
Etionamida (Eto) 	Tiocarbamidas	Inibição da síntese de ácido micólico através da ligação à proteína transportadora enoil-acil redutase (InhA) após ativação prévia por monooxigenase (EthA).
Protionamida (Pto) 		
Cicloserina (Cs) 	Aminoácidos (análogos da D-alanina)	Inibição da síntese de peptidoglicano que compete com D-alanina por racemase de L-alanina e D-alanina:D-alanina ligase.
Trazodona (Trd) 		
Linezolida (Lzd) 	Oxazolidinona	Inibição da síntese de proteínas pela ligação à subunidade ribossômica 50S.

Clofazimina (Cfz) 	Fenazina	Depleção de energia na membrana; geração de espécies reativas de oxigénio (ROS).
Grupo D. Agentes complementares (componentes não principais do regime MDR-TB)		
D1.		
Pirazinamida (Z) 	Pirazina	Requer ativação da pirazinamidase (PncA) no ácido pirazinóico que se acumula dentro dos bacilos a pH ácido, interrompendo o potencial da membrana e o transporte da membrana; inibe a tradução pela ligação à proteína ribossómica S1, a síntese de ácidos gordos pela ligação à sintase de ácidos gordos (FAS) I e a síntese de pantotenato e co-enzima A pela ligação à aspartato descarboxilase (PanD).
Etambutol (E) 	Etilenodiamina	Inibição da síntese de arabinogalactano pela ligação a arabinosil transferases.
Isoniazida em altas doses (H) 	Hidrazida	Inibição da síntese de ácido micólico pela ligação à proteína transportadora InhA após ativação por uma catalase / peroxidase (KatG).
D2.		

Bedaquilina (Bdq) 	Diarilquinolina	Inibição da produção de ATP por ligação à ATP sintase.
Delamanid (Dlm) 	Nitroimidazol	Inibição da síntese de ácido micólico e depleção do metabolismo energético através da geração de espécies reativas de nitrogênio após ativação por uma nitroredutase (Ddn).
D3.		
Ácido para-aminosalicílico (PAS) 	Salicilato	Inibição da síntese de folato pela ligação da di-hidrofolato redutase (DHFR) que requer ativação da di-hidropteroato-sintase (DHPS) e da di-hidrofolato-sintase (DHFS); inibição da absorção de ferro.
Imipenem (Imp) 	Inibidor da carbapenem / dipeptidase	Inibição da síntese de peptidoglicano pela ligação às proteínas de ligação à penicilina (PBPs); os antibióticos b-lactâmicos requerem um inibidor das b-lactamases bacterianas (clavulanato) e os carbapenêmicos podem exigir um inibidor das dipeptidases renais para evitar a inativação.
Cilastatina (Cln) 		
Meropenem (Mpm)	Carbapenem	

		
Amoxicilina (Amx) 	Inibidor da aminopenicilina / b- lactamase	
Clavulanato (Clv) 		
Tioacetazona (T) 	Tiosemicarbazona	Inibição da síntese de ácido micólico pela ligação ao ácido ciclopropano micólico sintase após ativação prévia por uma EthA.

1.3. Produtos naturais no tratamento da TB

Devido ao aparecimento e disseminação da TB resistente e à demora e complexidade do seu tratamento, tornou-se essencial usar novos agentes terapêuticos com novos mecanismos de ação ou o uso de agentes terapêuticos combinados, garantindo assim uma maior eficácia e um melhor perfil de segurança. (Faustino et al., 2020)

Os produtos naturais continuam a ser uma ótima fonte de agentes químicos (ex. antibióticos) que possuem uma ampla gama de bioatividade, contribuindo para várias áreas terapêuticas como é o caso do cancro e doenças infecciosas, onde se inclui a TB. (Faustino et al., 2020)

Tal como referido anteriormente, os produtos naturais apresentam uma fonte única de compostos protótipo essenciais ao desenvolvimento de fármacos. Assim, a diversidade

química oferecida pela natureza inclui metabolitos secundários isolados de plantas, bactérias, fungos, organismos marinhos e algas, como é o caso dos terpenos, esteróis, alcalóides, aromáticos, policetídeos e polipeptídeos. Grande parte destes metabolitos apresentam atividade antimicrobiana e têm por isso sido muito utilizados no tratamento de várias patologias como é o caso das infeções bacterianas. (Faustino et al., 2020)

Com a disseminação da TB e o aparecimento de resistências, continua a ser importante identificar novos agentes terapêuticos que permitam controlar a infeção por Mtb e reduzir as mortes devido a esta patologia. Assim, tem havido um interesse renovado em compostos de origem natural que permitam o desenvolvimento de compostos protótipo para que conduzam ao desenvolvimento de fármacos anti-TB. Estes compostos apresentam estruturas químicas complexas e podem ser importantes em interações específicas como é o caso do reconhecimento de potenciais alvos macromoleculares nos microrganismos patogénicos. (Andrade et al., 2018)

M. smegmatis é uma micobactéria não patogénica frequentemente utilizada como primeira abordagem nos estudos anti-tuberculares uma vez que é mais fácil de semear e funciona como um bom organismo modelo de Mtb. Embora assim não seja possível chegar a uma conclusão sobre o tratamento da TB já que não se procede ao estudo da sua estirpe, o *M. smegmatis* é bastante útil na compreensão dos processos celulares que são importantes às micobactérias patogénicas. (Andrade et al., 2018)

1.4. *Plectranthus* spp.

As plantas do género *Plectranthus* pertencem à família Lamiaceae e encontram-se amplamente distribuídas na África tropical, Ásia e Austrália. Este género apresenta um grande interesse medicinal pelo seu uso etnofarmacológico onde se incluem patologias cutâneas, respiratórias e gastrointestinais e ainda dor, infeções e febre. Devido ao seu uso popular, tornou-se importante validar o mesmo através do isolamento dos metabolitos bioativos de *Plectranthus* spp. Os principais constituintes destas plantas são diterpenos com esqueleto de halimano, abietano, kaurano, clerodano e labdano, mas existem também triterpenóides de esqueleto de ursano, oleanano e triterpenóides de lupano, fitosteróis, flavonóides e ainda outros compostos polifenólicos. (Andrade et al., 2018)

Várias espécies de *Plectranthus* possuem atividade antimicrobiana característica em extratos e compostos. Este trabalho focou-se em *P. ornatus*, uma planta medicinal pertencente a esta espécie e cujas folhas são usadas no tratamento de doenças digestivas devido à sua ação antibiótica. (Andrade et al., 2018)

Em trabalhos anteriores foi relatada a atividade antimicrobiana do diterpeno halimano, um composto de *P. ornatus* obtido a partir do extrato acetónico. Este composto apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivo, como é o caso de *M. smegmatis*. (Andrade et al., 2018)

Devido à etnofarmacologia promissora de *P. ornatus*, o objetivo principal passou pela realização de uma avaliação preliminar anti-tubercular de um composto halimano e de dois compostos labdano, previamente isolados a partir desta planta medicinal. Assim, a atividade anti-tubercular destes compostos foi avaliada pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI) responsável por inibir o crescimento das micobactérias em $\geq 99\%$ (CMI99) após avaliação citotóxica em células de macrófagos isoladas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). (Andrade et al., 2018)

2. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos a análise da atividade anti-micobacteriana assim como o estudo estrutural de compostos do género *Plectranthus*, nomeadamente do tipo halimano e labdano.

Inicialmente procedeu-se à análise da atividade do extrato de *P. ornatus*, o que permitiu proceder ao isolamento de compostos com características promissoras no tratamento da TB.

Para a análise da atividade anti-micobacteriana dos compostos de halimano e labdano previamente isolados, foram utilizadas técnicas como o isolamento de células mononucleares de sangue periférico, o ensaio do lactato desidrogenase e o método de microdiluição para avaliação anti-microbiana.

Uma vez que o diterpeno halimano apresentou características mais favoráveis para o seu uso no tratamento da TB, procedeu-se ao estudo estrutural do mesmo.

Assim, foram utilizadas as técnicas de resolução de estrutura por difração de raios-X em monocristal (SCXRD), caracterização por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise de microscopia de placa quente (HSM). Estas técnicas serão posteriormente descritas de forma mais pormenorizada.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes, materiais e equipamentos

Na análise da atividade anti-micobacteriana, os reagentes Rifampicina, Triton X-100, Tween 80 e solução tamponada de fosfatos (PBS) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. O ácido fosfórico e o dimetil sulfóxido (DMSO) foram adquiridos à Merck. As *microbeads* magnéticas conjugadas anti-CD14 foram fornecidas por Miltenyi. O Lymphoprep foi obtido em Cedarlane. O kit de análise de citotoxicidade não-radioativa CytoTox® 96 (G1780) foi fornecido pela Promega. (Andrade et al., 2018)

Na extração e isolamento, a cromatografia líquida em coluna foi realizada com sílica gel (Merck 9385) e utilizou-se como solventes o *n*-hexano, acetato de etilo e metanol, e a cromatografia em coluna flash seca foi realizada com sílica gel (Merck 7734 e 9385). A cromatografia em camada fina (TLC) foi realizada com placas de sílica gel comerciais (Merck 60 F254). A visualização dos cromatogramas desenvolvidos foi realizada por fluorescência (lâmpada de 254 nm) e quando necessário, por coloração com solução metanólico de ácido sulfúrico (lâmpada de 366 nm).

Sempre que necessário, os solventes foram purificados por destilação.

Na preparação dos cristais de halimano para proceder à difração de raios-X em monocristal (SCXRD) foi utilizado Fomblin, adquirido à Sigma-Aldrich.

Os dados de SCXRD foram recolhidos à temperatura ambiente num difractómetro AXS-KAPPA APEX II, utilizando radiação monocromática (Mo- α). A resolução da estrutura foi obtida através do programa SHELXT 2014/4. (Sheldrick, 2015) Os refinamentos das estruturas foram efetuados com recurso ao SHELXL 2014/7 (Sheldrick, 2015) incluído no programa WINGX-versão 2014.1. (Farrugia, 1999) Todos os átomos, exceto os hidrogénios, foram refinados anisotropicamente pelo método dos mínimos quadrados de matriz inteira. Os átomos de hidrogénio foram adicionados em posições calculadas e refinados juntamente com o átomo correspondente. As figuras foram geradas no programa MERCURY 2020.2.0. (Macrae et al., 2008)

Os dados de FTIR foram adquiridos num espectroscópio Nexus-Thermo Nicolet, realizando uma média de 64 scans com uma resolução máxima de 4 cm^{-1} , registando o espectro no intervalo $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$. As amostras foram diluídas em KBr (1:100).

Os dados de HSM foram obtidos usando um controlador conectado a uma placa de platina Linkam LTS350. As imagens foram recolhidas através do *software* de imagem Cell, com uma lupa Olympus SZX10. Os cristais foram colocados sob uma gota de óleo Fomblin, para uma melhor visualização de libertação de bolhas de solvente ou de produtos de decomposição, caso se verificassem.

3.2. Material vegetal

A planta medicinal *Plectranthus ornatus* Codd. originária da África do Sul, foi cultivado no campus do Instituto Superior de Agronomia (Lisboa). O *voucher* do espécime da planta foi identificado por Eurico S. Martins, e depositados no Herbário do Instituto de Investigação Científica Tropical, em Lisboa (ref. C. Marques S/Nº LISC). (Andrade et al., 2018)

3.3. Estirpe microbiana

O *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 607) foi cultivado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, com agitação, em meio Middlebrook 7H9 (Difco) e suplementado com 10% de albumina-dextrosecatalase (ADC), 0,2% de glicerol e 0,05% de Tween 80. (Andrade et al., 2018)

3.4. Isolamento dos compostos halimano e labdano

O ácido (11R*,13E)-11-acetoxihalima-5,13-dien-15-óico (**Composto 1**), os diterpenos de labdano Plectrornatina C (**Composto 2**) e os compostos semelhantes a forscolinas, mistura 1:1 de 1,6-di-O-acetilforscolina e 1,6-di-O-acetil-9-desoxiforscolina (**Composto 3**), foram previamente isolados de *Plectranthus ornatus* Codd (**Figura 2**). (Rijo et al., 2007; Rijo et al. 2012)

Tal como referido anteriormente, os compostos foram obtidos através de um estudo fitoquímico previamente realizado nesta planta, por estudos bioguiados. A elucidação estrutural dos metabolitos bioativos baseou-se em dados físico-químicos (como ponto de fusão e rotação específica), principalmente espectroscópicos UV, IR, 1D e espectros 2D ¹H e ¹³C-RMN, espectros de massa, análise elementar e em comparação com dados bibliográficos. (Rijo et al., 2007; Rijo et al. 2012)

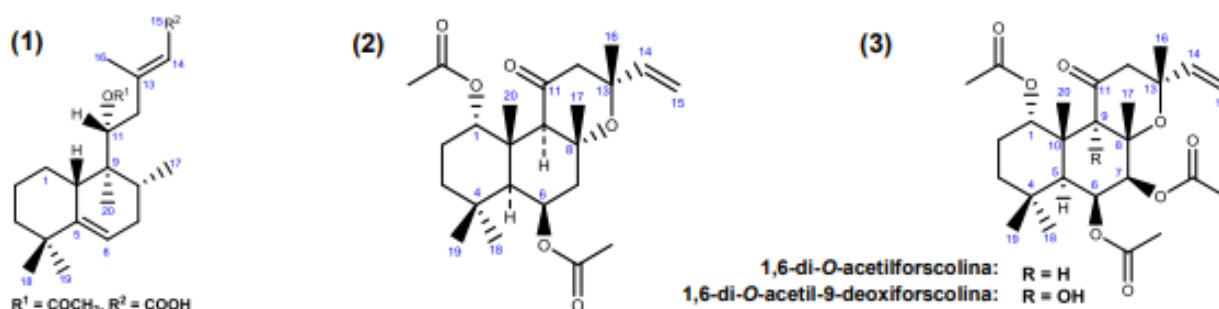


Figura 2. Diterpenos de halimano (1) e labdano (2-3) isolados de *Plectranthus ornatus*, em estudo.

(Rijo et al., 2007; Rijo et al. 2012; Reproduzido de (Andrade et al., 2018))

3.5. Avaliação citotóxica dos compostos halimano e labdano

3.5.1. Isolamento de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

Tal como referido anteriormente, este trabalho foi realizado em colaboração do projecto de doutoramento da Joana Andrade.

Para a realização desta técnica, as PBMC foram isoladas a partir de doadores de sangue, sendo estes indivíduos saudáveis e voluntários. Estas células foram obtidas por centrifugação com gradiente de densidade de *Ficoll* usando *Lymphoprep*. (Andrade et al., 2018)

Posteriormente, os monócitos foram purificados por triagem positiva utilizando *microbeads* anti-CD14 magnéticas conjugadas. As células recuperadas foram >99 % CD14⁺,

o que foi possível determinar por citometria de fluxo com anticorpo anti-CD14. (Andrade et al., 2018)

Finalmente, os monócitos foram cultivados em placas de 48 poços a $5,0 \times 10^5$ células/mL em meio X-VIVO suplementado com 2 % de soro humano, e foram incubadas durante 5 dias a 37 °C numa atmosfera de CO₂ humidificada a 5%. Às culturas em análise não foram adicionados quaisquer antibióticos. (Andrade et al., 2018)

3.5.2. Ensaio do lactato desidrogenase (LDH)

Tal como referido anteriormente, este trabalho foi realizado em colaboração do projecto de doutoramento da Joana Andrade.

Este ensaio permitiu avaliar a citotoxicidade dos compostos 1 e 2 expostos aos macrófagos humanos. Para tal, foi utilizado o kit de ensaio de citotoxicidade não radioativa CytoTox 96 (Promega G1780). (Andrade et al., 2018)

Após 48 horas de adesão celular, as células foram incubadas com os compostos em análise possuindo concentrações próximas da concentração mínima inibitória. Este valor foi testado contra *M. smegmatis* (25 µg/mL) em trabalhos anteriores. (Andrade et al., 2018)

Foram utilizados dois controlos positivos: a solução de lise proveniente do kit e a estaurosporina (2 µM), sendo a primeira constituída por 9% (v/v) de Triton X-100 em água (correspondente à libertação de 100% de LDH). Os sobrenadantes foram preparados em duas diluições (1:10 e 1:100). (Andrade et al., 2018)

Assim, a libertação de LDH foi medida através do fornecimento de lactato, NAD⁺ e iodonitrotetrazólio (INT) violeta como substratos na presença de diaforase. A mistura de substrato foi preparada com o tampão de ensaio (PBS contendo 0,2 g/L KCl, 8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KH₂PO₄, 1,15 g/L Na₂HPO₄ e 1% (m/v) de albumina de soro bovino) de acordo com as instruções do fabricante, tendo sido posteriormente adicionados 50 µL a cada poço e incubados durante 30 minutos no escuro. Após a incubação, foi adicionado 50 µL de solução *stop* (ácido acético 1 M) e procedeu-se à quantificação do produto formazano vermelho através de medições de absorvência a 490 nm, num leitor de microplacas. (Andrade et al., 2018)

Realizou-se ainda um controlo de libertação máxima de LDH através da congelação das placas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e reaquecendo-as posteriormente a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. (Andrade et al., 2018)

3.5.3. Método de microdiluição para avaliação anti-micobacteriana

Tal como referido anteriormente, este trabalho foi realizado em colaboração do projecto de doutoramento da Joana Andrade.

As CMI responsáveis por inibir o crescimento das micobactérias em $\geq 99\%$ foram determinadas através do ensaio de diluição seriada 1:2. (Andrade et al., 2018)

Os compostos em estudo foram dissolvidos em DMSO e diluídos em concentrações variáveis entre 100 a $0,097\text{ }\mu\text{g/mL}$, em meio Mueller-Hinton. Foi ainda avaliada a atividade antimicrobiana do solvente DMSO e da rifampicina, usada como controlo. (Andrade et al., 2018)

Os valores de CMI considerados dizem respeito à menor concentração do composto que permitiu inibir em $\geq 99\%$ o crescimento dos microrganismos após 24 horas de incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Estes valores encontram-se apresentados em $\mu\text{g/mL}$. (Andrade et al., 2018)

Foi possível medir o crescimento microbiano com o auxílio de um leitor de microplacas de absorção ajustado para 620 nm (*Termo Scientific Multiskan FC*) e os ensaios foram realizados em triplicado. (Andrade et al., 2018)

3.5.4. Análise estatística

Tal como referido anteriormente, este trabalho foi realizado em colaboração do projecto de doutoramento da Joana Andrade.

A comparação de dados foi realizada por análise da variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste *pos-hoc* de diferença significativa honesta Tukey para comparações em pares, utilizando o *software* GraphPad Prism versão 5 (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, EUA). (Andrade et al., 2018)

Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todos os ensaios foram realizados pelo menos em triplicado e os resultados encontram-se apresentados como mediana $\pm$ desvio padrão (SD). (Andrade et al., 2018)

3.6. Extração do composto halimano

O processo de extração do diterpeno halimano foi realizado através de procedimentos adaptados de um estudo realizado anteriormente com outra planta da espécie *Plectranthus*. (Rijo et al., 2007)

Tal como já foi referido, este trabalho foi realizado em colaboração do projecto de doutoramento da Joana Andrade.

Inicialmente procedeu-se à secagem ao ar e pulverização de toda a planta medicinal *P. ornatus* (1,261 kg). A extração foi realizada com acetona, três vezes, utilizando o aparelho de ultrassons durante aproximadamente meia hora, à temperatura ambiente. O volume total de solvente gasto correspondeu a aproximadamente 13 L.

Seguidamente, procedeu-se à filtração e evaporação do solvente. Este processo realizou-se no evaporador rotativo e permitiu obter um extrato seco de 89,30 g. O processo de extração apresentou assim um rendimento de extracção de 7,082% (m/m).

3.7. Isolamento do composto halimano

O processo de isolamento do diterpeno halimano foi realizado através de procedimentos adaptados de um estudo realizado anteriormente com outra planta da espécie *Plectranthus*. (Rijo et al., 2007)

Este processo teve como objetivo a obtenção de frações que possuísem este composto. Para tal, o extrato bruto foi submetido a várias separações cromatográficas.

Assim, foram realizadas as colunas cromatográficas A1, A2, A3, B1, B2 e C, tal como ilustrado no **Esquema 1**. As frações obtidas em cada separação cromatográfica assim como os eluentes utilizados podem ser consultados nas **Tabelas 2 a 6**.

Em primeiro lugar, realizou-se uma coluna líquida sequencial (**Coluna A1**) com 65,80 g de extrato, tendo sido possível obter 14 frações (**Tabela 2**). A eluição ocorreu em gradiente de polaridade, iniciando com *n*-hexano (C₆H₁₄) a 100% e aumentando (de 1 em 1%) a concentração de acetato de etilo (C₄H₈O₂) utilizado, até este atingir os 100%. No fim, utilizou-se como eluente uma mistura de acetato de etilo e metanol (CH₃OH).

Esta coluna inicial permitiu analisar as diferenças de composição das frações obtidas, indicadas por TLC, ao longo do processo de extração. Deste modo, além de permitir a identificação do composto halimano, foi ainda possível estruturar melhor a realização das colunas seguintes.

Tabela 2. Coluna cromatográfica A1 do extrato de *P. ornatus*.

Fração	Quantidade (g)	Eluente (%) C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂	Eluente (%) C ₄ H ₈ O ₂ : CH ₃ OH
1	3,1645	100:0	-
2	1,7171	99:1	-
3	0,5489	98:2	-
4	0,1564	97:3	-
5	0,0950	96:4	-
6	0,1286	95:5	-
7	0,2692	94:6	-
8	0,1980	90:10	-
9	1,2371	87:13	-
10	2,1518	85:15	-
11	0,1498	80:20	-
12	18,4075	70:30	-
13	18,3218	0:100	-
14	5,1491	-	90:10
Total	51,6948		

Tendo em conta os resultados obtidos na primeira coluna realizada, foi explorada uma estratégia alternativa para as separações cromatográficas seguintes, utilizando como método a cromatografia em coluna *flash* seca.

Assim, de seguida realizaram-se duas colunas *flash* (**Colunas A2 e A3**) com sílica gel com 4 e 10 g de extrato, respetivamente. Em ambos os casos, foi possível obter 4 frações (**Tabela 3**).

Tabela 3. Colunas cromatográficas A2 e A3 do extrato de *P. ornatus*.

Coluna	Fração	Quantidade (g)	Eluente (%) C ₆ H ₁₄ : C ₄ H ₈ O ₂	Eluente (%) C ₄ H ₈ O ₂ : CH ₃ OH
A2	1	2,0992	80:20	-
	2	0,6590	80:20	-
	3	0,2557	80:20	-
	4	0,1289	-	90:10
	Total	3,1428		
A3	1	8,3387	80:20	-
	2	0,8637	80:20	-
	3	0,2037	80:20	-
	4	0,0762	-	90:10
	Total	9,4823		

As frações resultantes das três colunas cromatográficas anteriores foram semelhantes entre si e foram agrupadas de acordo com a polaridade das misturas observadas no TLC de fase móvel correspondente a diclorometano:acetona (95:5).

Assim sendo, procedeu-se à junção das frações F13 e F14 provenientes da coluna A1 com a fração 1 da coluna A2 (massa total aplicada de aproximadamente 26 g) e realizou-se uma nova coluna seca (**Coluna B1**) da qual se obtiveram 4 frações (**Tabela 4**).

Tabela 4. Coluna cromatográfica B1 do extrato de *P. ornatus*.

Fração	Quantidade (g)	Eluente (%) $C_6H_{14} : C_4H_8O_2$	Eluente (%) $C_4H_8O_2 : CH_3OH$
1	18,1846	80:20	-
2	0,8432	80:20	-
3	0,8289	0:100	-
4	1,8284	-	90:10
Total	21,6851		

A partir da fração 12 da coluna A1 realizou-se uma nova coluna seca (**Coluna B2**), tendo sido possível obter 5 frações (**Tabela 5**).

Tabela 5. Coluna cromatográfica B2 do extrato de *P. ornatus*.

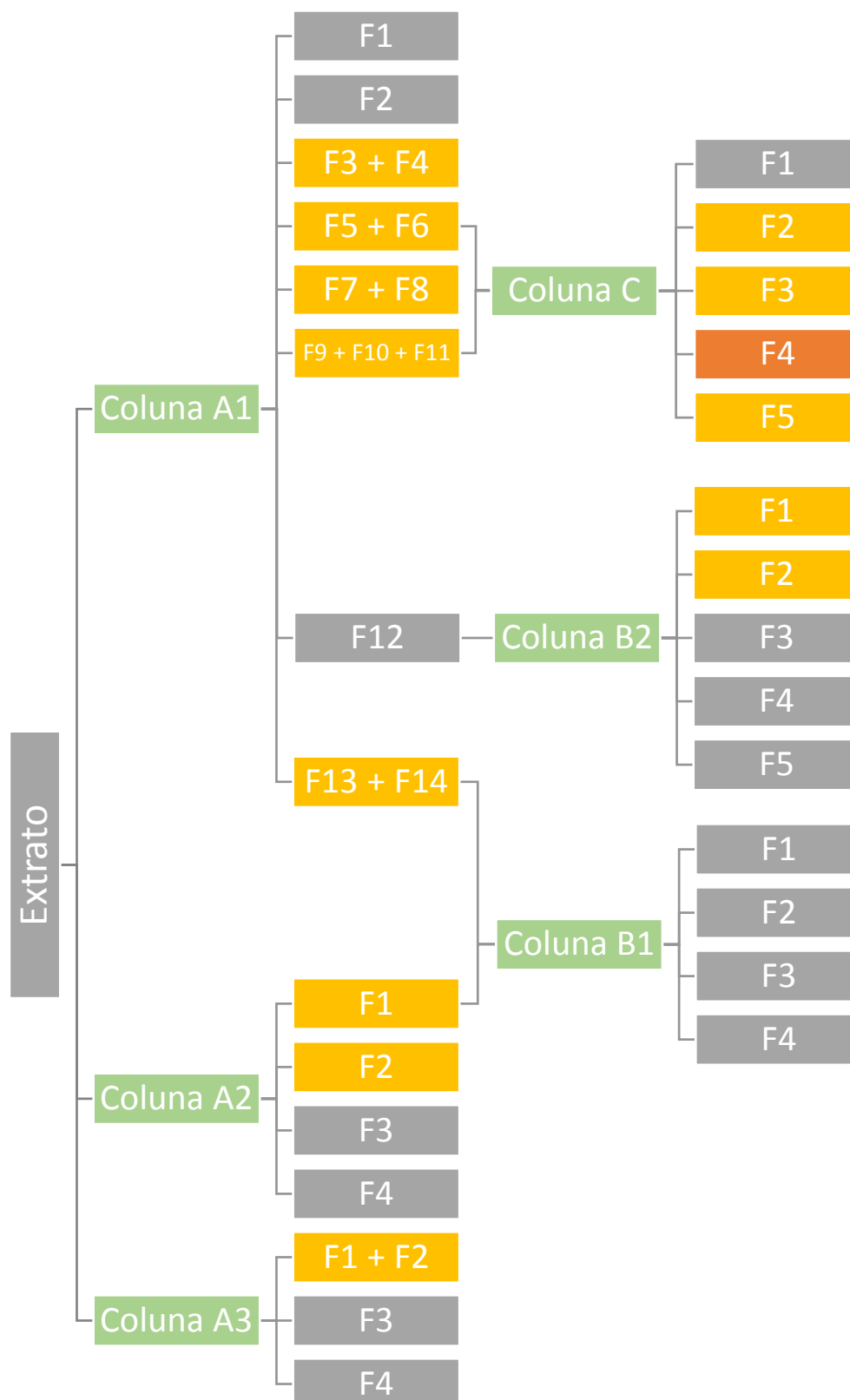
Fração	Quantidade (g)	Eluente (%) $C_6H_{14} : C_4H_8O_2$	Eluente (%) $C_4H_8O_2 : CH_3OH$
1	39,1994	80:20	-
2	25,6246	80:20	-
3	0,1940	80:20	-
4	0,2230	0:100	-
5	0,2070	-	90:10
Total	65,448		

Finalmente, as frações 5, 6, 9, 10 e 11 da coluna A1 foram combinadas (massa total aplicada de 3,7623 g) e o resíduo obtido foi aplicado numa nova coluna seca (**Coluna C**) onde se obtiveram 5 frações (**Tabela 6**).

Tabela 6. Coluna cromatográfica C do extrato de *P. ornatus*.

Fração	Quantidade (g)	Eluente (%) $C_6H_{14} : C_4H_8O_2$	Eluente (%) $C_4H_8O_2 : CH_3OH$
1	2,3469	80:20	-
2	0,2997	80:20	-
3	0,2029	80:20	-
4	0,1429	0:100	-
5	0,0788	-	90:10
Total	3,0712		

No **Esquema 1**, encontra-se resumido o processo de separação cromatográfica. As frações que se suspeitava conterem halimano ou que revelaram alguns resíduos deste diterpeno estão apresentadas por caixas amarelas. A caixa laranja representa a fração que continha halimano puro.



Esquema 1. Isolamento do diterpeno halimano a partir do extrato de *P. ornatus*: colunas A a C.

3.8. Recristalização do composto halimano

A pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos têm envolvido maioritariamente moléculas que possuem propriedades micromeríticas e solubilidade aquosa limitadas. É graças à engenharia da morfologia total das partículas farmacêuticas que se torna possível obter a forma, tamanho e/ou área de superfície desejável. Este processo possui muitas vantagens como é o caso da melhoria das propriedades físico-químicas dos princípios ativos. (El-Zhry El-Yafi & El-Zein, 2014)

Os materiais que se encontram no estado sólido dependem do empacotamento interno das suas moléculas, podendo ser encontrados na forma cristalina (com uma ordem definida) ou amorfa (sem ordem tridimensional de longo alcance). Assim sendo, cada mudança no empacotamento interno de um material no estado sólido provoca mudanças nas suas propriedades (ex. massa, propriedades físico-químicas). (El-Zhry El-Yafi & El-Zein, 2014)

A cristalização tornou-se o método mais comum na produção de partículas sólidas, tornando-se assim um método essencial uma vez que a forma cristalina da maioria das substâncias ativas dos fármacos permite melhorar as suas propriedades físico-químicas assim como a sua pureza. (El-Zhry El-Yafi & El-Zein, 2014)

A recristalização diz respeito a um conjunto de processos que conduz ao relaxamento da tensão em extensões variadas de um material, provocando a libertação de energia armazenada quando tratado termicamente com uma temperatura apropriada. Este método de transformação é essencial para projetar microestruturas eficientes nas substâncias a analisar. (Alaneme & Okotete, 2019)

Assim, este processo é fundamental na purificação de compostos. Além disso, a formação de cristais permite uma melhor determinação da estrutura molecular da substância em estudo através de estudos de difração de raios-X em monocristal. (Javadzadeh, Hamedeyazdan, & Asnaashari, 2012)

A recristalização do composto halimano que permitiu obter 5,3 mg do composto puro foi realizada em *n*-pentano e acetato de etilo através da lavagem da fração 4 obtida a partir da

coluna C, tal como descrito na literatura. (Rijo, Gaspar-Marques, Simões, Jimeno, & Rodríguez, 2007)

3.9. Estudos estruturais do composto halimano

3.9.1. Análise microscópica e recristalização

O método de microscopia é normalmente utilizado no estudo de polimorfismos, uma vez que as substâncias polimórficas geralmente diferem na sua morfologia. Assim, este é um método importante na análise preliminar da monitorização de cristalizações. (Rodríguez-Spong, Price, Jayasankar, Matzger, & Rodríguez-Hornedo, 2004)

Tendo em conta a análise microscópica do composto halimano obtido e a necessidade de cristais com propriedades específicas para as técnicas seguintes, procedeu-se a uma nova recristalização deste diterpeno. Como solvente utilizou-se uma mistura de água e metanol (1:1).

3.9.2. Difração de raios-X em monocristal (SCXRD)

Quando é possível obter cristais com qualidade e dimensões apropriadas, a determinação da estrutura cristalina de um composto é usualmente realizada através da difração de raios-X em monocristal (SCXRD). (Datta & Grant, 2004)

A SCXRD é importante para a determinação estrutural de materiais cristalinos, permitindo compreender a relação entre as suas estruturas e propriedades. Permite ainda obter coordenadas atómicas precisas, comprimentos e ângulos de ligação, deslocamentos térmicos atómicos e ocupações. (Zhang, Liao, Zhou, Lin, & Chen, 2014)

Assim, esta é uma técnica analítica não destrutiva que fornece dados abrangentes sobre a estrutura cristalina interna de uma substância. (Bhatia et al., 2018)

Como vantagens, este método apresenta a sua maior resolução, permitindo uma visualização mais precisa dos locais de ligação que por sua vez pode conduzir a uma melhor perceção do mecanismo de ação das substâncias em estudo. Como desvantagens, esta técnica requer qualidade dos cristais e apresenta uma estrutura estática com pouca informação em

termos de dinâmica que pode não ser representativa do estado ativo da substância em estudo.
(Egli, 2015)

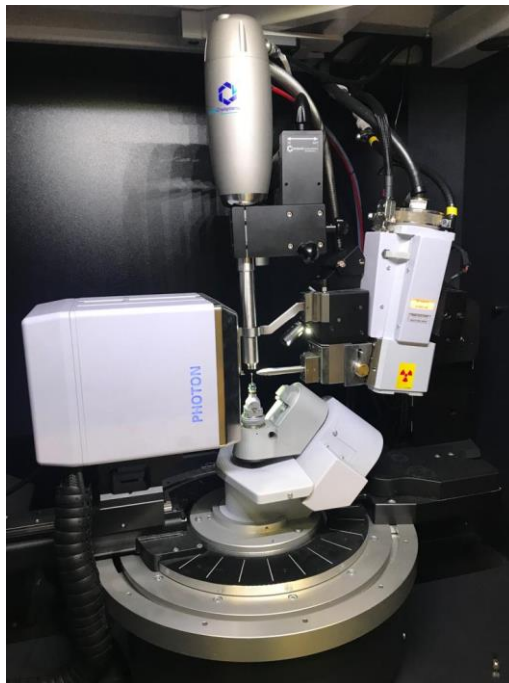


Figura 3. Equipamento de SCXRD.

(Centro de Química Estrutural - Instituto Superior Técnico)

3.9.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho (IV) tem sido um dos métodos espectroscópicos vibracionais mais utilizado para a caracterização de compostos no estado sólido. Assim, esta técnica consiste na observação dos modos vibracionais associados à absorção de um determinado composto na região infravermelha do espectro. (Rodríguez-Spong et al., 2004)

Este tipo de técnicas baseia-se na medição da ligação molecular dos compostos em vibração, excitados por radiação a uma frequência adequada. (Duygu, Baykal, Açikgöz, & Yildiz, 2009)

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier analisa as propriedades vibracionais de aminoácidos e cofatores, sensíveis a mudanças estruturais

mínimas. É assim possível utilizar esta técnica para selecionar vibrações correspondentes a grupos químicos envolvidos numa reação específica. (Berthomieu & Hienerwadel, 2009)

Atualmente, o FTIR tornou-se um método bastante usado pois possui aplicações alimentares, farmacêuticas e ainda medicinais. Esta técnica apresenta vantagens relativamente a outras como é o caso da facilidade de preparação da amostra, rapidez e facilidade das medições, necessidade de apenas uma pequena quantidade de amostra e ainda o facto de não necessitar de solventes, tornando-se assim um método bastante mais económico. (Hafizah, Noh, Fadhillah, Azmin, & Amid, 2017)

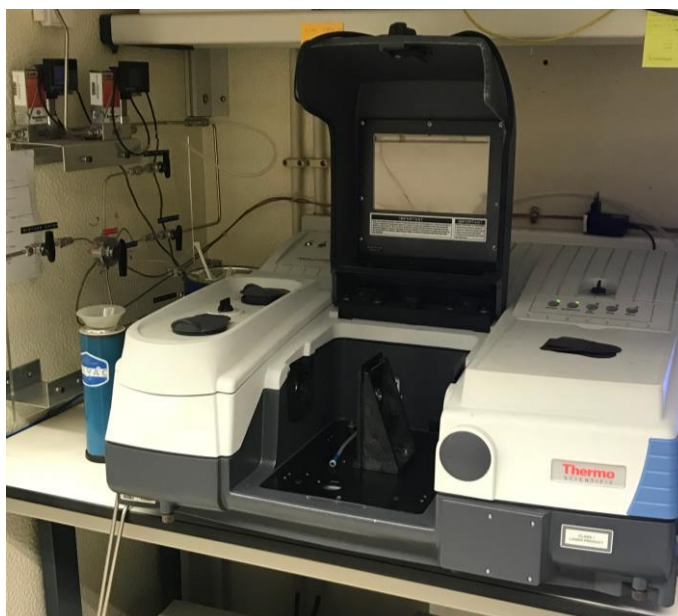


Figura 4. Equipamento de FTIR.

(Centro de Química Estrutural - Instituto Superior Técnico)

3.9.4. Análise de microscopia de placa quente (HSM)

A microscopia térmica consiste na combinação da microscopia e da análise térmica para permitir o estudo e a caracterização física dos materiais em função da temperatura e do tempo. (Stieger, Aucamp, Zhang, & Villiers, 2012)

A microscopia de placa quente é uma técnica bastante usada para estudar a transição de fase em cristais. Consiste na visualização de uma determinada substância ao microscópio

enquanto se varia a temperatura, oferecendo assim uma grande variedade de informação sobre o comportamento de fusão/recristalização da substância e ainda sobre as suas transformações no estado sólido. (Rodríguez-Spong et al., 2004)

A HSM permite obter dados importantes sobre a morfologia e as propriedades de estado sólido de ingredientes farmacêuticos ativos (APIs) assim como de outras substâncias relevantes a nível farmacêutico. Esta técnica permite observar o processo de cristalização, dessolvatação, polimorfismo, transições de fase, pontos de fusão e ebulição, entre outros. (Kumar, Singh, & Nanda, 2020)

Este método é frequentemente utilizado como uma técnica complementar à calorimetria diferencial de varrimento (DSC), já que esta última mede a quantidade de energia absorvida ou libertada por uma amostra aquando esta é arrefecida, aquecida ou mesmo mantida a uma temperatura constante, permitindo assim obter dados termodinâmicos sobre a substância em estudo (ex. ponto de fusão). Por este motivo, combinação destas técnicas tem-se mostrado bastante vantajosa particularmente em estudos *in situ* com resultados bastante claros. (Šimek, Grünwaldová, & Kratochvíl, 2014)

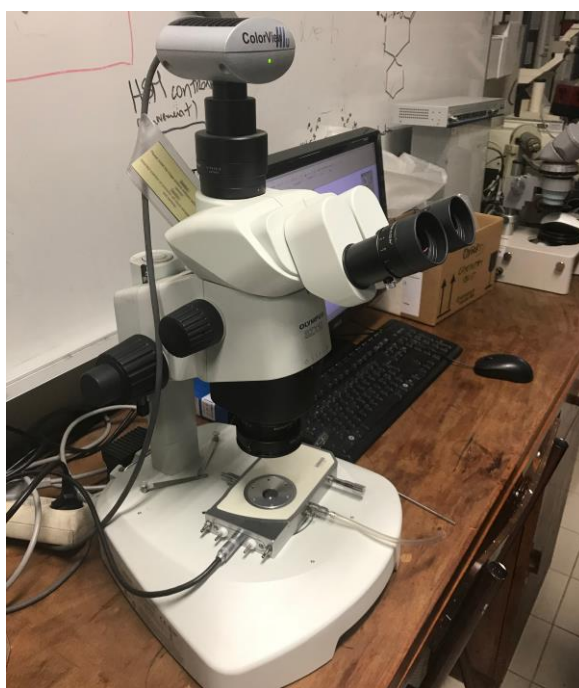


Figura 5. Equipamento de HSM.

(Centro de Química Estrutural - Instituto Superior Técnico)

4. Resultados e Discussão

4.1. Atividade anti-micobacteriana dos compostos halimano e labdano

A avaliação da atividade anti-micobacteriana dos diterpenos em estudo foi realizada através da análise quantitativa do crescimento de *M. smegmatis* através da determinação dos valores de CMI. Embora esta micobactéria não seja o agente causador da TB, é ainda assim um bom modelo preliminar que permite avaliar os possíveis novos agentes contra esta patologia. (Andrade et al., 2018)

Foi realizada uma avaliação citotóxica para evitar falsos positivos resultantes da citotoxicidade dos compostos presentes nas células. O teste de citotoxicidade permitiu medir a libertação da enzima citosólica LDH após tratamento dos macrófagos, derivados de PBMC, com os compostos 1 e 2. Uma vez que a estaurosporina ($IC_{50} = 250 \text{ nM}$) é um conhecido inibidor de proteínas cinase responsáveis por induzir a apoptose, foi usada como controlo positivo. Os resultados obtidos encontram-se na **Tabela 7**. (Andrade et al., 2018)

Tabela 7. Ensaio de citotoxicidade LDH para os diterpenos halimano (1) e labdanos (2) isolados de *P. ornatus*, testados com os valores de MIC. Os dados são expressos como mediana $\pm$ desvio padrão ($n = 3$); *** $p < 0,0001$. Para a atribuição química do número composto, consultar a **Figura 2**.

(Adaptado de (Andrade et al., 2018))

Composto	Citotoxicidade (%)
STS (estaurosporina $2 \mu\text{M}$, controlo positivo)	21,9 ***
Controlo positivo do kit (9 % (v/v) Triton X-100 correspondente a 100 % da libertação de LDH)	82,9
Controlo negativo (células não tratadas)	10,1
1	8,75
2	9,82
3	Não tratado

Tal como é possível observar na **Tabela 7**, a estaurosporina (controlo positivo) resultou numa citotoxicidade dos macrófagos de 21,86% ($p < 0,0001$). Adicionalmente, os compostos em estudo não apresentaram toxicidade significativa para os macrófagos ($p > 0,05$), já que é possível observar que a viabilidade celular foi semelhante aos valores obtidos nas células não tratadas (controlo negativo). (Andrade et al., 2018)

Relativamente aos compostos 1-3, estes não revelaram atividade contra *M. smegmatis* (valores de CMI ≥ 100 $\mu\text{g/mL}$) quando comparados com o controlo positivo, a rifampicina (CMI 3,75 ng/mL). Contudo, quando comparados os diterpenos de labdano (**Compostos 2 e 3**) com o diterpeno halimano (**Composto 1**), foi possível observar que este último é o mais ativo pois possui um valor de CMI de 100 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela 8**. (Andrade et al., 2018)

Tabela 8. Valores de CMI dos compostos 1-3 isolados de *P. ornatus*, obtidos pelo método de microdiluição contra *M. smegmatis*. A rifampicina foi usada como controlo positivo. Os valores de CMI foram tomados como a menor concentração do composto que inibiu $\geq 99\%$ do crescimento do microrganismo após 24 horas de incubação a 37 °C e encontram-se apresentados em $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

(Adaptado de (Andrade et al., 2018))

Composto	<i>M. smegmatis</i>
	CMI ₉₉ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	100
2	> 100
3	> 100
Controlo positivo	3,75 RIF

Assim, revela-se a necessidade de realizar estudos adicionais como é o caso da formulação farmacêutica de novos derivados de halimano puro e testes contra o Mtb para melhor compreender a sua atividade tuberculostática e melhorar a sua eficácia. (Andrade et al., 2018)

4.2. Extração e isolamento do composto halimano

Para este estudo fitoquímico foi utilizada toda a planta medicinal *P. ornatus*. O extrato acetónico obtido apresentou um rendimento de 7,082% (m/m).

Em estudos anteriores, o extrato acetónico proveniente da maceração desta planta permitiu obter um rendimento de 5,41%. (Rijo, Rodriguez, Duarte, & Simões, 2012)

Comparando os dois valores, é possível concluir que o método de ultrassons é o mais eficaz na extração de *P. ornatus*.

A aplicação de ondas ultra-sónicas ao solvente permite acelerar a dissolução e difusão do soluto. Além disso, a transferência de calor permite melhorar a eficácia da extração. Esta técnica apresenta ainda como vantagem o facto de necessitar de pouco solvente e possuir um baixo consumo de energia, com uma redução da temperatura e do tempo de extração. (Zhang, Lin, & Ye, 2018)

Atualmente estão descritos dois solventes usados para extração de *P. ornatus*. Os extratos obtidos com acetona apresentam resultados mais eficazes (rendimento de 5,41% (m/m)) quando comparados com os extratos obtidos com *n*-hexano (rendimento de 1,40% (m/m)). Tendo em conta estes dados, para este estudo foi selecionada a acetona como solvente extrator. (Rijo et al., 2012)

O diterpeno halimano, o composto principal de *P. ornatus*, foi isolado por cromatografia em coluna líquida sequencial seguida de cromatografia *flash* seca.

Em estudos anteriores, o processo de isolamento foi realizado utilizando dois sistemas de eluentes: *n*-hexano com acetato de etilo (Oliveira et al., 2005) e petróleo com acetato de etilo (Rijo et al., 2002).

Assim, por razões económicas e pela semelhança entre os dois sistemas de eluentes, foi utilizada como fase estacionária uma mistura dos solventes *n*-hexano e acetato de etilo para a extração deste diterpeno.

Uma vez que foi possível obter frações com o diterpeno halimano e em quantidades bastante significativas, é possível concluir que a escolha destes solventes foi uma boa opção.

4.3. Recristalização do composto halimano

Este processo foi realizado de acordo com a literatura, procedendo à lavagem da fracção 4 obtida a partir da coluna C com os solventes *n*-pentano e acetato de etilo, o que permitiu obter cristais puros de halimano (5,3 mg). (Rijo et al., 2007)

Tendo em conta a análise microscópica dos cristais obtidos inicialmente, procedeu-se a uma nova recristalização do composto utilizando água e metanol (1:1), o que permitiu obter cristais com características mais favoráveis às técnicas que se pretendiam realizar posteriormente. Os cristais obtidos podem ser observados na **Figura 6**.



Figura 6. Cristais de halimano observados ao microscópio após segunda recristalização.

(Centro de Química Estrutural - Instituto Superior Técnico)

4.4. Estudos estruturais do composto halimano

A avaliação estrutural deste composto foi realizada com o auxílio de três técnicas realizadas no Centro de Química Estrutural - Instituto Superior Técnico: SCXRD, FTIR e HSM.

Assim, após a obtenção de cristais de halimano com as características desejadas, procedeu-se à determinação da estrutura deste composto através da técnica de difração de raios-X em monocristal.

Na **Figura 7** é possível observar a estrutura obtida e na **Tabela 9** encontram-se apresentados os dados obtidos por esta técnica.

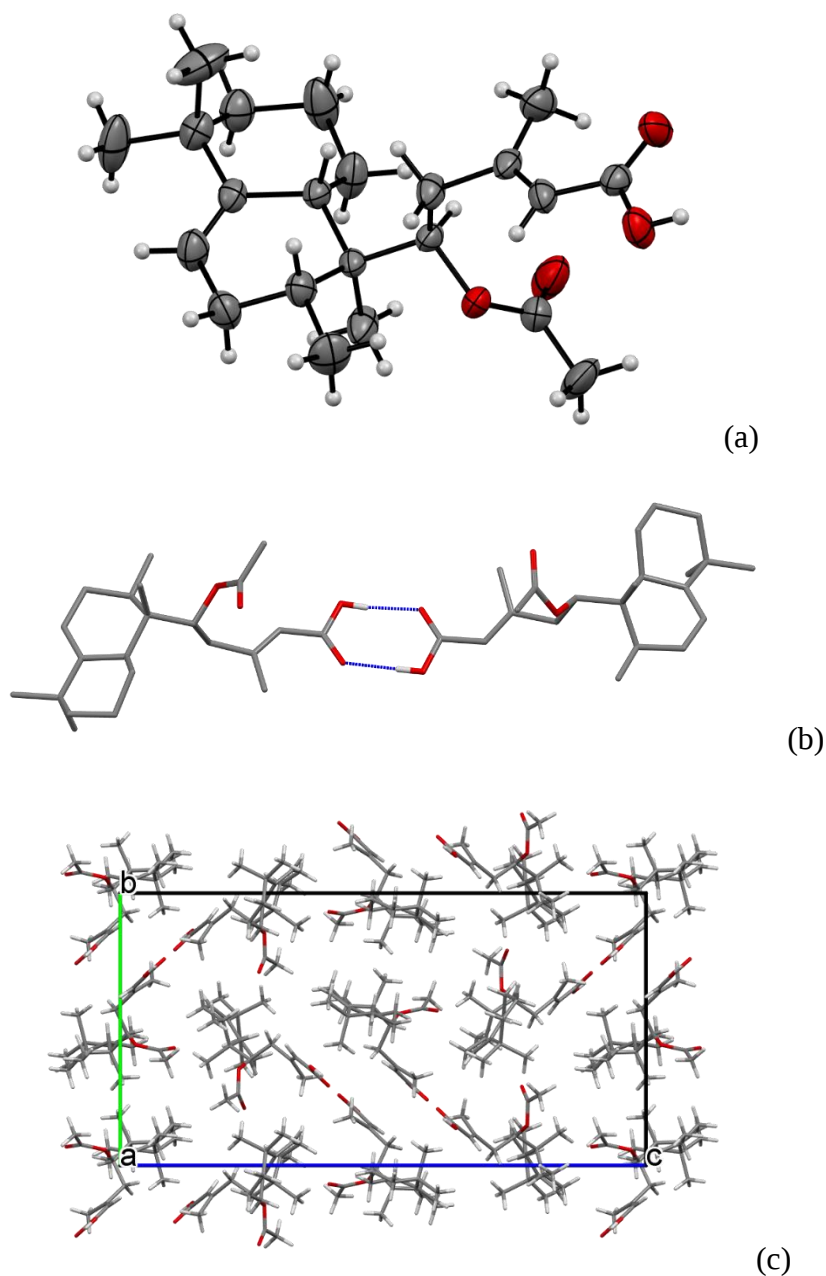


Figura 7. Estrutura do halimano obtida por SCXRD (elipsóides definidos a 30% de probabilidade) (a); Representação do sintão $R_2^2(8)$, com as respectivas pontes de hidrogénio representadas a azul (b); Empacotamento supramolecular, visto ao longo de a (c).

(Centro de Química Estrutural - Instituto Superior Técnico)

Tabela 9. Parâmetros cristalográficos obtidos por SCXRD e refinamento da estrutura do composto.

Fórmula empírica	C ₄₄ H ₆₈ N ₀ O ₈	
Peso molecular	724,98	
Temperatura	293(2) K	
Comprimento de onda	0,71073 Å	
Sistema cristalino	Ortorrômbico	
Grupo espacial	P 21 21 21	
Dimensões da célula unitária	a = 10,4736(10) Å	$\alpha = 90^\circ$
	b = 14,7302(13) Å	$\beta = 90^\circ$
	c = 28,496(3) Å	$\gamma = 90^\circ$
Volume	4396,4(7) Å ³	
Z	4	
Densidade calculada	1,095 mg/m ³	
Coeficiente de absorção	0,074 mm ⁻¹	
F(000)	1584	
Tamanho do cristal	0,080 x 0,040 x 0,030 mm	
Cor do cristal	N/A	
Limites de θ recolhidos	2,386 a 34,421 °	
Índices limitantes	-16 ≤ h ≤ 16, -23 ≤ k ≤ 23, -45 ≤ l ≤ 45	
Reflexões recolhidas/únicas	77210 / 18437 [R(int) = 0,3651]	
Totalidade para $\theta = 25,242^\circ$	99,9 %	
Correção de absorção	Nenhuma	
Método de refinamento	Mínimos quadrados de matriz completa em F ²	
Dados/restrições/parâmetros	18437 / 0 / 469	
Bondade em F²	0,941	
Índices R finais [$I > 2 \sigma(I)$]	R1 = 0,1491, wR2 = 0,1886	
Índices R (todos os dados)	R1 = 0,5277, wR2 = 0,3037	
Coeficiente de extinção	N/A	
Densid. eletrónica min e max	0,173 e -0,187 e.Å ⁻³	

A estrutura deste composto apresenta uma simetria ortorrômbica, cristalizando no grupo espacial $P2_12_12_1$. Todas as distâncias de ligação e ângulos estão de acordo com o esperado para este tipo de compostos. Os grupos carboxílicos estão envolvidos em ligações por pontes de hidrogénio, dando origem a sintões $R_2^2(8)$ (**Figura 7b**) que se repetem ao longo do empacotamento supramolecular (**Figura 7c**). No entanto, é importante ressaltar que embora tenha sido possível determinar a estrutura do halimano, a qualidade dos cristais não permitiu obter dados com qualidade adequada para publicação, pelo que novas recristalizações com vista ao crescimento de mais monocristais estão em progresso.

De seguida completou-se a análise da estrutura molecular do halimano utilizando a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (**Figura 8**).

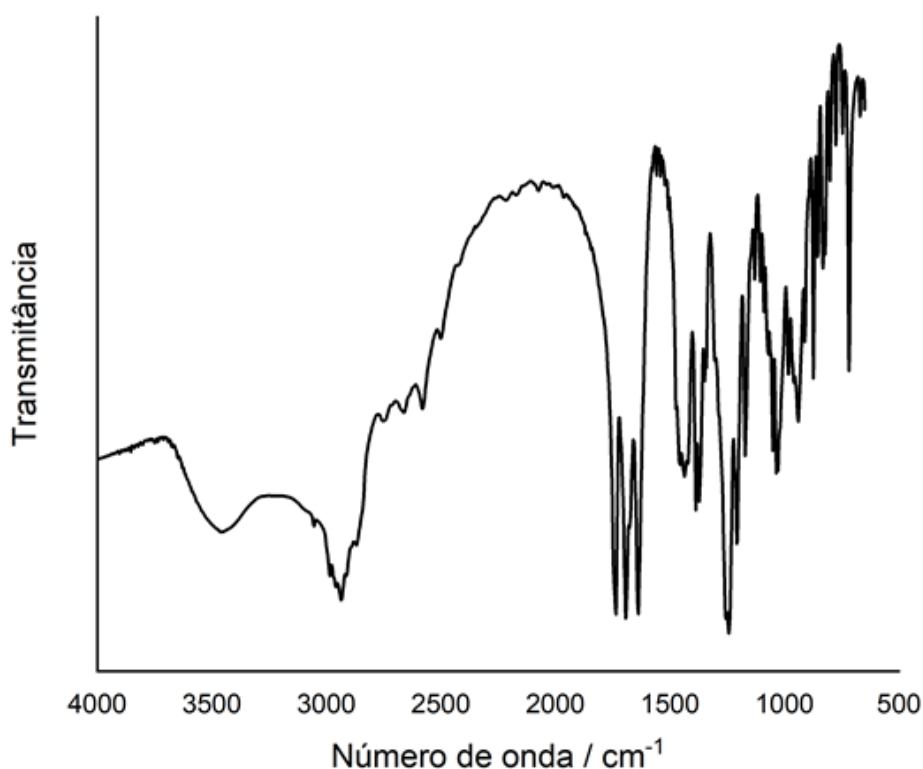


Figura 8. Análise do halimano por FTIR.

(Centro de Química Estrutural - Instituto Superior Técnico)

A espectroscopia de infravermelho suporta a estrutura cristalina determinada por SCXRD. Assim, as bandas características do composto halimano a 2931 e 1736 cm^{-1}

correspondem ao grupo carboxílico (O-H) e ao ester (C=O), respetivamente. É ainda possível observar um *stretch* com duas ou mais bandas no intervalo de 1300 a 1000 cm^{-1} .

Finalmente procedeu-se à análise do comportamento do halimano ao aumento de temperatura através da técnica de microscopia de placa quente (**Figura 9**).

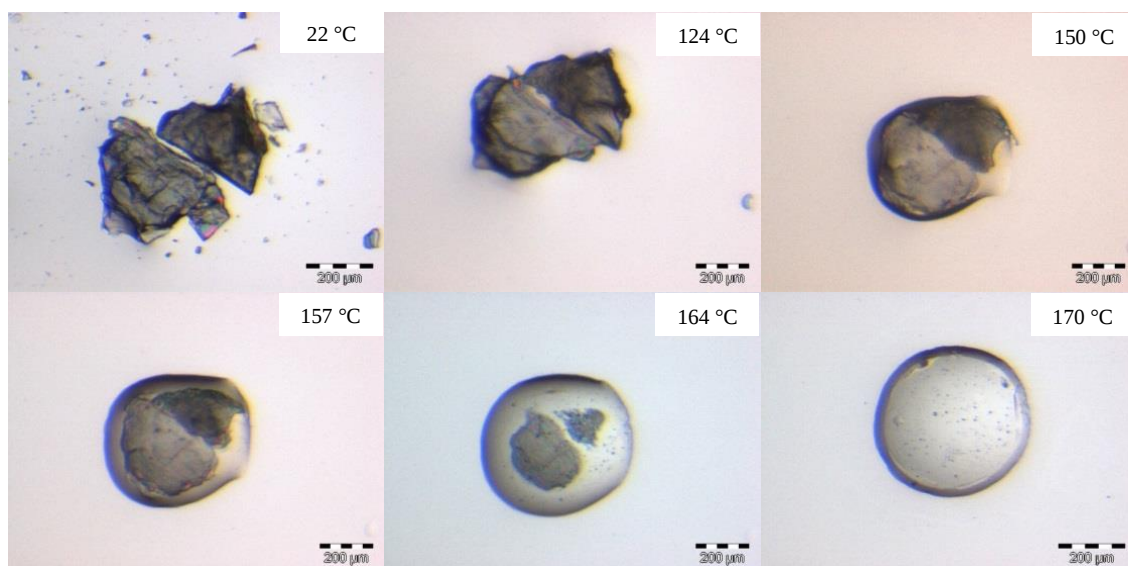


Figura 9. Análise do halimano por HSM.

(Centro de Química Estrutural - Instituto Superior Técnico)

O halimano mostrou-se estável até à sua fusão completa, que ocorreu a aproximadamente 170 °C.

5. Conclusão

O aparecimento e disseminação da TB multirresistente e excessivamente resistente a medicamentos levou a que se intensificassem os esforços para descobrir novos agentes anti-TB que possuam um novo modo de ação contra novos alvos de Mtb. (Faustino et al., 2020)

Assim, é ainda necessário realizar pesquisas futuras sobre produtos naturais antimicobacterianos que possuam como principal objetivo a identificação de possíveis moléculas protótipo contra alvos novos e específicos de Mtb com atividade contra Mtb replicante e inativo, incluindo MDR-TB e XDR-TB. Para tal é essencial aumentar a biodisponibilidade dos fármacos e baixar a sua toxicidade para que se possa garantir uma maior eficácia de um regime de tratamento mais curto, o que permite o aumento da adesão à terapêutica por parte do paciente e ainda evita o desenvolvimento de resistência aos fármacos usados. (Faustino et al., 2020)

Os diterpenos de halimano (**Compostos 1**) e labdano (**Compostos 2 e 3**) foram avaliados num ensaio preliminar da atividade antimicobacteriana contra *M. smegmatis* onde primeiramente os compostos foram testados quanto à sua toxicidade em macrófagos derivados de PBMC, não tendo sido encontrada qualquer citotoxicidade até 25 µg/mL. (Andrade et al., 2018)

Os valores de CMI₉₉ dos compostos 1-3 (≥ 100 µg/mL) não revelaram atividade significativa contra *M. smegmatis* quando comparados com a rifampicina (controlo positivo). No entanto, estão a ser realizados estudos adicionais contra Mtb para confirmar os resultados obtidos e eventualmente elucidar o mecanismo de ação assim como melhorar a atividade dos compostos derivados por hemisíntese. (Andrade et al., 2018)

Utilizando o método de ultrassons, foi possível obter um extrato acetónico de toda a planta medicinal *P. ornatus* com um rendimento de 7,082% (m/m). O composto protótipo halimano foi isolado a partir do extrato acetónico de *P. ornatus*, obtendo-se 5,3 mg de composto puro.

Foi possível determinar a estrutura cristalina do halimano através de dados de difração de raios-X em monocristal. Dados de FTIR complementaram a informação estrutural do

composto. A análise de HSM mostrou que o ponto de fusão deste composto é de aproximadamente 170 °C.

Futuramente pretende-se proceder à quantificação do diterpeno halimano em todas as frações obtidas utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). Assim, obtendo-se grandes quantidades deste composto, torna-se possível preparar novos derivados e estudar melhor a sua atividade biológica.

Referências bibliográficas

- Alaneme, K. K., & Okotete, E. A. (2019). Recrystallization mechanisms and microstructure development in emerging metallic materials: A review. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2018.12.007>
- Andrade, J. M., Romagnoli, A., Almeida, J. F., Ferreira, I. M., Garcia, C., Díaz-Lanza, A., et. al., (2018). Anti-mycobacterial activity of labdane and halimane diterpenes obtained from *Plectranthus ornatus* Codd. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 15(1), 101–110. <https://doi.org/10.19277/bbr.15.1.179>
- Bernardes, C. E. S., Garcia, C., Pereira, F., Mota, J., Pereira, P., Cebola, M. J., et. al., (2018). Extraction Optimization and Structural and Thermal Characterization of the Antimicrobial Abietane 7 α -Acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone. *Molecular Pharmaceutics*, 15(4), 1412–1419. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00892>
- Berthomieu, C., & Hienerwadel, R. (2009). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Photosynthesis Research*. <https://doi.org/10.1007/s11120-009-9439-x>
- Bhatia, A., Chopra, S., Nagpal, K., Deb, P. K., Tekade, M., & Tekade, R. K. (2018). Polymorphism and its Implications in Pharmaceutical Product Development. In *Dosage Form Design Parameters* (Vol. 2, pp. 31–65). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814421-3.00002-6>
- Datta, S., & Grant, D. J. W. (2004). Crystal structures of drugs: Advances in determination, prediction and engineering. *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd1280>
- Duygu, D., Baykal, T., Açikgöz, D., & Yildiz, K. (2009). Fourier Transform Infrared (FT-IR) Spectroscopy for Biological Studies. *Journal of Science* (Vol. 22). Retrieved from www.gujs.org
- Egli, M. (2015). Structural and biophysical methods to analyze clock function and mechanism. In *Methods in Enzymology* (Vol. 551, pp. 223–266). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.10.004>

- El-Zhry El-Yafi, A. K., & El-Zein, H. (2014). Technical crystallization for application in pharmaceutical material engineering: Review article. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. Shenyang Pharmaceutical University. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2015.03.003>
- Farrugia, L. J. (1999). WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. *Journal of Applied Crystallography*, 32(4), 837–838. <https://doi.org/10.1107/S0021889899006020>
- Faustino, C., Andrade, J. M., Ferreira, I. M., Almeida, J. F., & Rijo, P. (2020). Lead molecules from natural products: Insight into tubercular targets. In *Studies in Natural Products Chemistry* (Vol. 65, pp. 41–84). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817905-5.00002-0>
- Hafizah, C., Noh, C., Fadhillah, N., Azmin, M., & Amid, A. (2017). Principal Component Analysis Application on Flavonoids Characterization. *Advances in Science, Technology and Engineering Systems Journal*, 2(3), 435–440. <https://doi.org/10.25046/aj020356>
- Javadzadeh, Y., Hamedeyazdan, S., & Asnaashari, S. (2012). Recrystallization of Drugs: Significance on Pharmaceutical Processing. In *Recrystallization*. InTech. <https://doi.org/10.5772/33156>
- Kumar, A., Singh, P., & Nanda, A. (2020). Hot stage microscopy and its applications in pharmaceutical characterization. *Applied Microscopy*. <https://doi.org/10.1186/s42649-020-00032-9>
- Macrae, C. F., Bruno, I. J., Chisholm, J. A., Edgington, P. R., McCabe, P., Pidcock, E., et. al., (2008). Mercury CSD 2.0 - New features for the visualization and investigation of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography*. <https://doi.org/10.1107/S0021889807067908>
- 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>
- 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., Rodriguez, B., Duarte, A., & Simões, M. de F. (2012). Antimicrobial Properties of *Plectranthus ornatus* Extracts, 11-acetoxyhalima-5, 13-dien-15-oic Acid Metabolite and its Derivatives. *The Natural Products Journale*, 1(1), 57–64. <https://doi.org/10.2174/2210315511101010057>
- Rodríguez-Spong, B., Price, C. P., Jayasankar, A., Matzger, A. J., & Rodríguez-Hornedo, N. (2004). General principles of pharmaceutical solid polymorphism: A supramolecular perspective. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(3), 241–274. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.005>
- Sheldrick, G. M. (2015). SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallographica Section A: Foundations of Crystallography*, 71(1), 3–8. <https://doi.org/10.1107/S2053273314026370>
- Šimek, M., Grünwaldová, V., & Kratochvíl, B. (2014). Hot-stage microscopy for determination of API particles in a formulated tablet. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/832452>
- Stieger, N., Aucamp, M., Zhang, S.-W., & Villiers, M. M. De. (2012). Hot-stage optical microscopy as an analytical tool to understand solid-state changes in pharmaceutical materials. Retrieved September 9, 2020, from https://www.researchgate.net/publication/289184706_Hot-stage_optical_microscopy_as_an_analytical_tool_to_understand_solid-state_changes_in_pharmaceutical_materials
- Zhang, J. P., Liao, P. Q., Zhou, H. L., Lin, R. B., & Chen, X. M. (2014). Single-crystal X-ray diffraction studies on structural transformations of porous coordination polymers. *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c4cs00129j>
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*.

Joana Sofia Ferreira de Almeida
Atividade anti-micobacteriana e estudo estrutural de diterpenos de halimano e labdano obtidos a partir de
Plectranthus ornatus Codd

BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>