

CLÁUDIA DE FÁTIMA SANTOS OLIVEIRA

**Pesquisa de atividade biológica de extratos de seis
espécies de *Plectranthus*: *P. cylindraceus*, *P.*
petiolaris, *P. spicatus*, *P. swynnertonii*, *P. Welwitschii*
e *P. woodii***

**Orientadora: Professora Doutora Patrícia Dias
Mendonça Rijo**

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

Lisboa

2019

CLÁUDIA DE FÁTIMA SANTOS OLIVEIRA

**Pesquisa de atividade biológica de extratos de seis
espécies de *Plectranthus*: *P. cylindraceus*, *P.*
petiolaris, *P. spicatus*, *P. swynnertonii*, *P. Welwitschii*
*e P. woodii***

Dissertação defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
no dia 29/04/2020, perante o júri, nomeado pelo
Despacho de Nomeação nº:41/2020, de 12 de fevereiro
de 2020, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutor Luís Monteiro Rodrigues;

Arguente: Prof^a. Doutora Mariana Reis;

Orientadora: Prof^a. Doutora Patrícia Dias Mendonça Rijo.

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

Lisboa

2019

Desenvolver força, coragem e paz interior demanda tempo. Não espere resultados rápidos e imediatos, sob o pretexto de que decidiu mudar. Cada ação que você executa permite que essa decisão se torne efetiva dentro de seu coração.

Dalai Lama

Lista de Publicações

Os resultados apresentados nesta dissertação, foram enviadas para publicação e deram origem a um artigo*.

I. Artigos

- *Ntungwe, E., Marçalo, J., Garcia, C., Teodósio, C., Oliveira, C. I., **Oliveira, C. F.**, Roberto, A., Rijo, P. (2017). Biological activity screening of seven *Plectranthus* species. *Journal Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 14(1), 95-108
- Ntungwe, E., Soares, J., Garcia, C., Teodósio, C., Oliveira, C. I., **Oliveira, C. S.** et al. Rijo, P. (2018). *7 α -Acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone* from *Plectranthus ramosior*: a screening study for anticancer lead molecules. *Planta médica, In preparation*.
- Garcia, C., Teodósio, C., Oliveira, C. I., **Oliveira, C. F.**, Diaz-Lanza, A., Reis, C., Duarte, N., Rijo, P. (2018). Naturally occurring *Plectranthus*-derived diterpenes with antitumoral activities. *Current Pharmaceutical Design*, 24, 4207-4236

II. Comunicações em painel

- Catarina Garcia, Carolina Oliveira, **Cláudia Oliveira**, Amílcar Roberto, Catarina Reis, Marisa Nicolai, Patrícia Rijo, “Determination of the antioxidante activity of medicinal plants extracts – a didactit approach”, *Biomed Biopharm Res.*, 2016; (13) 2:, 273-290
- Catarina Garcia, Carolina Oliveira, **Cláudia Oliveira**, Amílcar Roberto, Catarina Reis, Marisa Nicolai, Patrícia Rijo, “Determination of the antioxidante activity of medicinal plants extracts – a didactit approach”, II Jornadas CBIOS, 12 Out, Lisboa, Pt, 2016
- Epole Ntungwe N, Joana Marçalo, Catarina Garcia, Catarina Reis, Catarina Teodósio, Carolina Oliveira, **Cláudia Oliveira**, Amílcar Roberto, Patrícia Rijo, “Biological activity screening of seven *Plectranthus* species: anticancer lead molecule search”; 4th Meeting of COST Action CM 1407, 18-20 set, Lisboa, Pt, 2017
- Henrique Silva, Ntungwe Epole, Joana Marçalo, Catarina Garcia, Catarina Reis, Catarina Teodósio, Carolina Oliveira, **Cláudia Oliveira**, Luís Rodrigues, Patrícia Rijo, “Estimation of acetylcholinesterase inhinition, antioxidante, antimicrobial activities and brine shrimp toxicity of seven *Plectranthus* species”; International Federation Congress (FIP), Estocolmo, Suécia, 2017

Pesquisa de atividade biológica de extratos de seis espécies de Plectranthus: P. cylindraceus, P. petiolaris, P. spicatus, P. swynnertonii, P. Welwitschii e P. woodii

- Carolina Oliveira, Catarina Teodósio, **Cláudia Oliveira**, Marisa Nicolai, Paula Pereira, Amílcar Roberto, Patrícia Rijo, “Antioxidant activity of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants”; 13º Congresso Nacional das Farmácias, 19 Out, Lisboa, Pt, 2018
- Catarina Teodósio, Carolina Oliveira, **Cláudia Oliveira**, Epole Ntungwe N, Joana M. Andrade, Vera Isca, Patrícia Rijo, “*Plectranthus* species as a source for anticancer lead molecules”; 13º Congresso Nacional das Farmácias, 19 Out, Lisboa, Pt, 2018

Agradecimento

Para que esta dissertação fosse realizada, pude contar com o apoio de enumeras pessoas, às quais sou muito grata. A todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram e/ou colaboraram comigo para que este trabalho fosse possível, os meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, queria agradecer a Deus, por nunca me faltar saúde, e mesmo nos momentos mais difíceis, dar-me sabedoria e força para ultrapassar todos os obstáculos, sem nunca desistir.

Aos meus pais, que mesmo com a distância, sempre se fizeram presentes, obrigada pelo apoio, desde o jardim de infância até à chegada a este mestrado. Sem vocês nada disso era possível e não teria o mesmo gosto. Obrigada por acreditarem em mim, até quando eu duvidei e por sempre terem uma palavra de afeto, que mesmo nos piores momentos, me faziam erguer a cabeça e continuar.

Aos meus irmãos, pelas brincadeiras, palavras de conforto e nunca duvidarem que este dia chegaria. O vosso apoio é muito importante para mim.

Gostaria também de agradecer em especial a minha orientadora, **Professora Dr.^a Patrícia Dias Mendonça Rijo**, pelo acompanhamento, apoio, paciência, conhecimento transmitido e motivação. Graças a si tive a oportunidade de fazer parte de projetos e como fruto dos mesmos, ter artigos e poster publicados. Sendo assim, muito obrigada por toda a amizade e carinho ao longo destes anos.

Às minhas colegas de curso e parceiras de projeto, Catarina Teodósio e Carolina Oliveira, muito obrigada por fazerem parte da minha vida, por apoiarem-me e ajudarem-me sempre que foi preciso. Levo comigo essa amizade eterna e a certeza de que sem o vosso apoio tudo teria sido muito mais difícil.

À Epole Ntungwe e a Catarina Garcia, também agradeço pelas horas de dedicação e apoio laboratorial, sempre com muita boa disposição, um sorriso no rosto, amizade e carinho.

Agradeço também ao Hospital CUF Descobertas e à Farmácia Gare do Oriente, que foram incansáveis em transmitir os seus conhecimentos. O vosso apoio e o excelente trabalho de equipa, fizeram com que eu me sentisse acolhida durante os meses de estágio.

Não seria justo deixar de agradecer a todos os docentes que acompanharam a minha caminhada durante o Mestrado, sempre dispostos a ajudar e compartilhando os seus vastos conhecimentos, que hoje fazem de mim, aquilo que sou.

Por fim quero fazer um especial agradecimento aos meus familiares em geral que sempre me motivaram e vibraram comigo a cada conquista, aos meus amigos aqui em Portugal e em Cabo Verde por sempre terem uma palavra de conforto quando mais precisei, mesmo não sendo possível estarem presentes muitas vezes, e por fim, mas que também foram muito importantes na minha trajetória académica, os meus colegas de curso que desde o início me acolheram e me fizeram sentir em casa.

A todos o meu sincero e profundo Muito Obrigada.

Resumo

O género *Plectranthus*, tem sido usado na medicina tradicional, sendo os diterpenos o grupo de compostos bioativos mais proeminentes.

Esta dissertação tem como objetivo avaliar a atividade biológica (atividades antimicrobiana e antioxidante, inibição da acetilcolinesterase -AChE- e toxicidade geral) de extratos acetónicos de seis espécies: *Plectranthus swynnertonii*, *P. welwitschii*, *P. woodii*, *P. cylindraceus*, *P. spicatus* e *P. petiolaris*.

Os extratos em estudo foram obtidos usando o método de extração por ultrassons (10% m/v), onde o *P. petiolaris* obteve o maior rendimento de extração (11,07 % m/m). No ensaio de inibição da AChE, o extrato de *P. cylindraceus* foi o mais ativo ($30,16 \pm 3,78\%$). A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em poços, contra bactérias Gram positivas, negativas e leveduras, porém, nenhum extrato demonstrou atividade antimicrobiana relevante.

A atividade antioxidante foi avaliada usando o método de DPPH, onde o extrato de *P. swynnertonii* demonstrou ser o mais ativo (20,24 %). No ensaio da toxicidade geral em *Artemia salina*, o extrato de *P. swynnertonii* foi o mais tóxico (CL₅₀ de 0,036 mg / L).

Em conclusão, os extratos de *P. cylindraceus* e de *P. swynnertonii* demonstraram um maior potencial para futuros trabalhos, nomeadamente, isolamento, caracterização estrutural e posterior citotoxicidade.

Palavras-chave: *Plectranthus*, diterpenos, acetilcolinesterase, antioxidante, antimicrobiano, toxicidade geral.

Abstract

The genus *Plectranthus*, has been used in traditional medicine, with diterpenes being the most prominent group of bioactive compounds.

This dissertation aims to evaluate the biological activity (antimicrobial and antioxidant activities, acetylcholinesterase -AChE- inhibition and general toxicity) of acetone extracts from six species: *Plectranthus swynnertonii*, *P. welwitschii*, *P. woodii*, *P. cylindraceus*, *P. spicatus* and *P. petiolaris*.

The extracts under study were obtained using the ultrasonic extraction method (10% m/v), where *P. petiolaris* obtained the highest extraction yield (11.07% m / m). In the AChE inhibition assay, *P. cylindraceus* was the most active ($30.16 \pm 3.78\%$). The antimicrobial activity was evaluated by the diffusion method in wells, against Gram-positive, negative and yeast bacteria, however, no extract showed relevant activity.

The antioxidant activity was evaluated using the DPPH method, where the extract of *P. swynnertonii* showed to be the most active (20.24%). In the general toxicity assay in *Artemia salina*, the extract of *P. swynnertonii* was the most toxic (LC50 of 0.036 mg / L).

In conclusion, the extracts of *P. cylindraceus* and *P. swynnertonii* demonstrated a greater potential for future works, namely, isolation, structural characterization and subsequent cytotoxicity.

Keywords: *Plectranthus*, diterpenes, acetylcholinesterase, antioxidant, antimicrobial, general toxicity.

Abreviaturas

%	Porcentagem
% (m/m)	Porcentagem massa por massa
% (m/v)	Porcentagem massa por volume
% (v/v)	Porcentagem volume por volume
®	Marca registrada
AA	Atividade antioxidante
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Hidroxianisol Butilado
BHT	Hidroxitolueno Butilado
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CI ₅₀	Concentração Inibitória Média
CL ₅₀	Concentração Letal Média
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
cm	Centímetro
CMB	Concentração Mínima Bactericida
CMF	Concentração Mínima Fungicida
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DA	Doença de Alzheimer
DL ₅₀	Dose Letal Média
DMSO	Dimetilsulfóxido

DPPH	2,2-Difenil-1-Picril-Hidrazina
DTNB	5,5'-Dithiobis (Ácido 2-Nitrobenzóico) ou Reagente de Ellman
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ERV	Enterococcus resistentes à vancomicina
FDA	Food and Drug Administration
g	Grama
HCl	Ácido Clorídrico
K₂Cr₂O₇	Dicromato de Potássio
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
nm	Nanómetro
nº	Número
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. cy</i>	<i>Plectranthus cylindraceus</i>
<i>P. pet</i>	<i>Plectranthus petiolaris</i>
<i>P. sp</i>	<i>Plectranthus spicatus</i>
<i>P. swy</i>	<i>Plectranthus swynnertonii</i>
<i>P. wel</i>	<i>Plectranthus welwitschii</i>
<i>P. woo</i>	<i>Plectranthus woodii</i>
ppm	Partes por milhão
RMN	Espetroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> metacilino-resistentes
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
UV	Ultravioleta
α	Alfa
β	Beta
$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

Índice

Lista de Publicações	i
I. Artigos	i
II. Comunicações em painel.....	i
Agradecimento	iii
Resumo	v
Abstract	vi
Abreviaturas.....	vii
Índice de Figuras	1
Índice de Gráficos.....	1
Índice de Tabelas	2
1. INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Atividade antitumoral de diterpenos obtidos de <i>Plectranthus</i>	5
1.1.1. Compostos naturais obtidos a partir de plantas aprovados em quimioterapia.	6
1.1.2. Potencial anticancerígeno do género <i>Plectranthus</i>	8
2. SECÇÃO EXPERIMENTAL	35
2.1. Reagentes.....	36
2.2. Equipamento.....	36
2.3. Material Vegetal	36
2.4. Microrganismos.....	36
2.5. Preparação dos extratos	37

2.6. Atividade antioxidante	37
2.6.1. DPPH – Ensaio qualitativo.....	38
2.6.2. DPPH – Ensaio quantitativo.....	39
2.7. Atividade antimicrobiana – Método de difusão em poços.....	39
2.8. Atividade <i>in vitro</i> da inibição da acetilcolinesterase.....	40
2.9. Ensaio de toxicidade geral em <i>Artemia salina</i> L.....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
3.1. Rendimento da extração por ultrassons.....	45
3.2. Atividade antioxidante pelo método de DPPH	46
3.2.1. Ensaio qualitativo	46
3.2.2. Ensaio quantitativo	47
3.3. Atividade antimicrobiana pelo Método de difusão em poços	48
3.4. Atividade <i>in vitro</i> da inibição da acetilcolinesterase	49
3.5. Ensaio de toxicidade geral com o modelo da <i>Artemia salina</i> L	50
4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	53
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
6. ANEXOS.....	60
6.1. Anexo I - Naturally Occurring <i>Plectranthus</i> -derived Diterpenes with Antitumoral Activities	61
6.2. Anexo II - Biological activity screening of seven <i>Plectranthus</i> species.....	61

Índice de Figuras

Figura 1: Estrutura química da morfina

Figura 2: Estrutura química do ácido acetilsalicílico

Figura 3: Estrutura química da salicina

Figura 4: *P. swynnertonii*

Figura 5: *P. welwitschii*

Figura 6: *P. woodii*

Figura 7: *P. cylindraceus*

Figura 8: *P. spicatus*

Figura 9: *P. petiolaris*

Figura 10: Procedimento da avaliação da atividade antimicrobiana usando o método de difusão em poços

Figura 11: Placa de 96 poços usada para realizar o ensaio *in vitro* da inibição da acetilcolinesterase – Método de Ellman

Figura 12: Resultado obtido da atividade antioxidante para os extratos analisados, assim como os controles, positivo e negativo, quercetina e acetona, respectivamente, usando o método de DPPH – qualitativo

Índice de Gráficos

Gráfico 1: Rendimento de extração (resíduo seco % m/m) das seis espécies de *Plectranthus*.

Gráfico 2: Resultado da determinação da Atividade antioxidante (%) de cada extrato estudado e da Quercetina (controle positivo).

Gráfico 3: Percentagem de inibição da acetilcolinesterase (AChE) das seis espécies de *Plectranthus* a uma concentração de 1 mg/mL

Gráfico 4: % de *Artemia Salina* morta correspondente ao seu respetivo extrato – ensaio de toxicidade geral.

Gráfico 5: Determinação da CL₅₀ do *P. swynnertonii*

Gráfico 6: Determinação da CL₅₀ do *P. cylindraceus*

Índice de Tabelas

Tabela 1: Agentes quimioterápicos derivados de plantas aprovados para uso clínico

Tabela 2: Estrutura química dos vários diterpenos isolados a partir de várias espécies de *Plectranthus*

Tabela 3: Usos Hortícolas e Domésticos das plantas *Plectranthus spp.* em estudo

Tabela 4: Dados relativos à atividade antioxidante dos controlos positivos, BHT e Quercetina - Ensaio quantitativo (DPPH)

Tabela 5: Resultado da atividade antimicrobiana dos seis extratos acetónicos usados no ensaio, pelo método de difusão em poços

Tabela 6: Concentração de DMSO (mg/mL) e respetiva % de *Artemias Salinas* mortas.

Tabela 7: Valores de LC₅₀ (mg/L) para os extratos mais ativos, usando o modelo de *Artemia Salina*

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido usadas a milhares de anos para elaborar vários produtos naturais, capazes de tratar diversas patologias, em forma de óleos, poções, infusões e remédios (Dias, Urban, & Roessner, 2012). Contudo, muito dos compostos bioativos encontrados nos produtos naturais não são identificados, o que faz com que nas últimas décadas, as mesmas têm vindo a ser usadas intensamente em estudos clínicos, farmacológicos e químicos (Dias et al., 2012; Rijo et al., 2012).

As plantas medicinais têm evoluído ao longo dos anos, adaptando-se cada vez mais ao meio ambiente, adquirindo a capacidade de resistirem ao clima, as bactérias, aos fungos e insetos (Dias et al., 2012). As suas propriedades etnofarmacológicas têm sido utilizadas como fonte principal para a invenção de novos fármacos, tendo em conta que, de acordo com os dados de 2012, da Organização Mundial da Saúde (OMS), 80 % da população dependem de medicamentos à base de plantas para a atenção primária à saúde e dos 122 destes medicamentos, 80 % estão a ser usados conforme o seu uso etnofarmacológico original (Dias et al., 2012; Rijo et al., 2012; Rijo et al., 2014).

Até os dias de hoje, provavelmente, o exemplo mais conhecido a nível mundial de fármacos originados a partir de produtos naturais, são a pesquisa de *Papaver somniferum* L. (papoula do ópio) que originou no isolamento de diversos alcaloides, no qual inclui a morfina (**Figura 1**) (Dias et al., 2012).

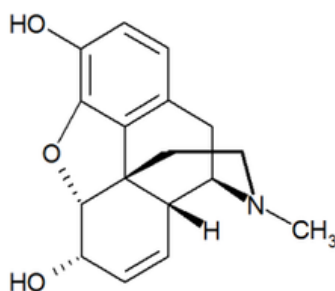


Figura 1: Estrutura química da morfina

Sendo assim, para que haja a evolução na descoberta de novos fármacos a base de produtos naturais, é necessário que haja uma melhoria na triagem, no isolamento e na caracterização química dos mesmos, afim de conhecer a composição química das plantas medicinais e confirmar os seus usos etnofarmacológicos (Dias et al., 2012; Rijo et al., 2012).

1.1. Atividade antitumoral de diterpenos obtidos de *Plectranthus*

O cancro continua sendo uma das principais causas mortais no mundo e sendo assim, o desenvolvimento de novas terapêuticas tem vindo a ter progressos notáveis. Os fármacos utilizados para o tratamento do cancro, são altamente eficazes a nível biológico, porém, os seus efeitos em relação ao hospedeiro, têm se mostrado bastante tóxicos. Como tal, o principal objetivo nos dias de hoje, tem sido a procura de uma terapia oncológica seletiva das células cancerígenas, visando não causar qualquer toxicidade para as células não tumorais (Garcia et al., 2018).

As plantas medicinais têm sido usadas ao longo dos anos na medicina tradicional em todo o mundo e, em particular, por populações asiáticas e africanas. Seu uso medicinal nas comunidades em desenvolvimento tem aumentado bastante, fazendo com que a comunidade científica aumente o seu interesse em descobrir os compostos responsáveis pelas suas propriedades e, portanto, fornecer a validação do seu uso (Garcia et al., 2018).

Por este motivo, as espécies do gênero *Plectranthus*, têm sido reconhecidas através do seu potencial antitumoral, devido aos seus metabólitos bioativos secundários. Vários compostos que são derivados de plantas, são aprovados para a quimioterapia, sendo que muitos deles apresentam padrões tóxicos e efeitos colaterais indesejáveis (Cragg & Newman, 2005; Demain & Vaishnav, 2011; Garcia et al., 2018).

As plantas têm a capacidade de produzir diversos metabólitos secundários que contribuem para a resposta de defesa a fatores externos, tais como os alcaloides, flavonoides, isoflavonóides, taninos, cumarinas e terpenos. Os terpenóides são o maior grupo de fitoquímicos e são as unidades de isopreno de cinco carbonos que definem a sua biogénese. Esse composto pode ser categorizado em classes como hemiterpenóides (C5), monoterpenóides (C10), sesquiterpenóides (C15), diterpenóides (C20), sesterterpenóides (C25), triterpenóides (C30) e tetraterpenos (C40) (Murthy, Ramalakshmi, & Srinivas, 2009; Smanski, Peterson, & Shen, 2012).

Estruturalmente, os diterpenos consistem em quatro unidades de isopreno (possuindo assim 20 átomos de carbono) e também quatro grupos metilo ramificados. Sua categorização química depende de várias classes de acordo com a ciclização de seu núcleo através do difosfato de difosfato (Garcia et al., 2018).

Esta classe de metabolitos é dividida em acíclico ou linear (fitano), bicíclico (labdane, clerodano), antidepressivos tricíclicos (pimarano, abietanos), tetracíclicos, diterpenos

pentacíclicos e macrocíclicos. A bioatividade dessa classe varia bastante, porém, estes compartilham propriedades em comum, essenciais para a saúde, como anti-inflamatório, antioxidante, antibacteriano, antidiabético e anticancerígeno, entre muitos outros (Mbaveng, Kuete, & Efferth, 2017; Muniyandi et al., 2017).

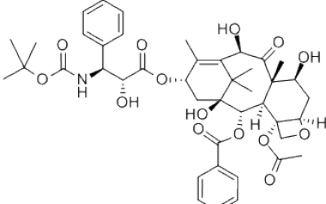
Estudos prévios relataram que os diterpenóides abietanos, embora presentes em muitas outras espécies, estão entre os mais diversos compostos encontrados no gênero *Plectranthus*, principalmente nas glândulas foliares (Garcia et al., 2018).

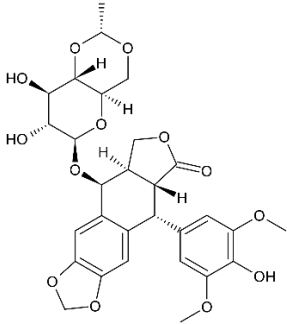
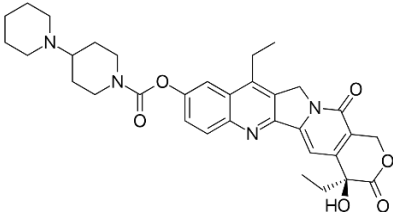
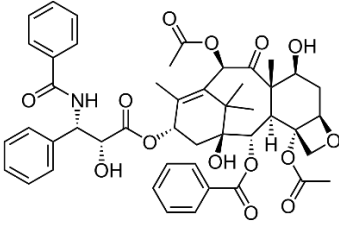
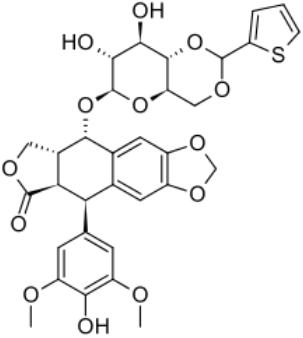
1.1.1. Compostos naturais obtidos a partir de plantas aprovados em quimioterapia

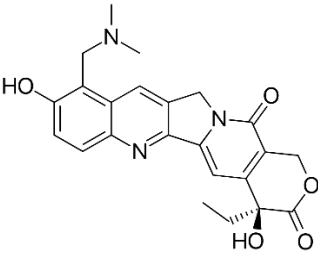
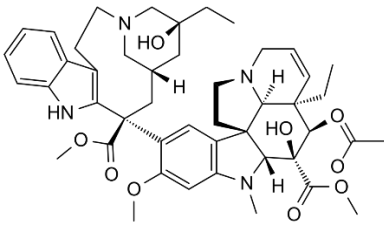
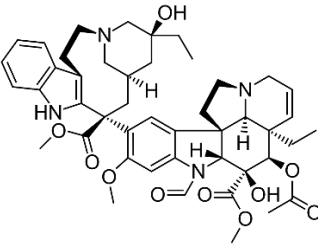
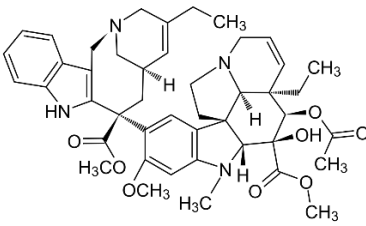
Atualmente mais de 50% dos fármacos usados na terapia oncológica derivam de plantas, facto esse que trouxe muito lucro para a indústria farmacêutica. No entanto têm como desvantagem, seus altos parâmetros tóxicos e efeitos colaterais associados (Demain & Vaishnav, 2011; Islam, 2017).

Tendo em isso em conta, vários produtos naturais têm sido o foco de muitos estudos, em busca de seus mecanismos de ação e desenvolvimento de novos alvos celulares. Existem alguns exemplos de terpenóides citotóxicos que são usados em contexto clínico, na qual podemos incluir o paclitaxel que é um dos diterpenos com maior destaque, por ser amplamente usado na quimioterapia (**Tabela 1**) (Cragg & Newman, 2005; Demain & Vaishnav, 2011).

Tabela 1: Agentes quimioterápicos derivados de plantas aprovados para uso clínico

<i>Agentes antineoplásicos derivados de produtos naturais aprovados para quimioterapia</i>	Mecanismo de ação	Estrutura química (classe) / Fonte botânica	Tratamento de cancro
<i>Docetaxel</i> 	Inibidor dos microtúbulos	Derivado de diterpenoide (Taxano)/ <i>Taxus brevifolia</i>	Cancro da mama, Cancro do pulmão de células não pequenas, Cancro da próstata refratário a terapia hormonal,

			Adenocarcinoma gástrico, Carcinoma de células escamosas do cancro de cabeça e pescoço
<i>Etoposido</i> 	Inibidor da Topoisomerase II	Derivado semissintético da podofilotoxina (Lignan)/ <i>Podophyllum peltatum</i>	Tumores testiculares refratários, Cancro do pulmão de pequenas células
<i>Irinotecano</i> 	Inibidor da Topoisomerase I	Alcaloide (Analogia da camptotecina) / <i>Camptotheca acuminata</i>	Carcinoma metastizado do cólon ou reto
<i>Paclitaxel</i> 	Inibidor dos microtúbulos	Derivado de diterpenoide (Taxano)/ <i>Taxus brevifolia</i>	Cancro da mama, Cancro do ovário, Cancro do pulmão de células não pequenas
<i>Teniposido</i> 	Inibidor da Topoisomerase II	Derivado semissintético da podofilotoxina (Lignan)/ <i>Podophyllum peltatum</i>	Leucemia linfoblástica aguda infantil refratária

<i>Topotecano</i> 	Inibidor da Topoisomerase I	Alcaloide (Analogia da camptotecina) / <i>Camptotheca acuminata</i>	Cancro cervical
<i>Vinblastina</i> 	Inibidor dos microtúbulos	Alcaloide (Alcaloide de vinca) / <i>Catharanthus rosea</i>	Cancro da mama, Coriocarcinoma, Linfoma de Hodgkin, Sarcoma de Kaposi, Linfoma não-Hodgkin, Cancro do testículo
<i>Vincristina</i> 	Inibidor dos microtúbulos	Alcaloide (Alcaloide de vinca) / <i>Catharanthus rosea</i>	Leucemia aguda, Doença de Hodgkin, Linfomas não-Hodgkin malignos, Rabdomyosarcoma, Neuroblastoma, Tumor de Wilms
<i>Vinorelbina</i> 	Inibidor dos microtúbulos	Alcaloide (Alcaloide de vinca) / <i>Catharanthus rosea</i>	Cancro do pulmão, Cancro da mama

1.1.2. Potencial anticancerígeno do género *Plectranthus*

A família Lamiaceae tem cerca de 200 géneros e é onde se encontra a maioria dos diterpenos. O *Plectranthus* contém mais de 300 espécies, particularmente encontrados na África Tropical, Ásia e Austrália. Devido a sua vasta diversidade biológica e variedade de espécie,

estes têm demonstrado vários usos na medicina tradicional, com potencial antimicrobiano, antioxidante, anti-inflamatório e antitumoral (Lukhoba, Simmonds, & Paton, 2006; Rice, Brits, Potgieter, & Staden, 2011; Rijo, Matias, Fernandes, Simões, & Nicolai, 2014)

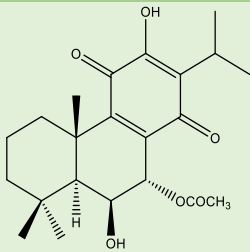
Uma enorme variedade de espécies de *Plectranthus* pertencentes a flora australiana, foram estudadas e os *P. amoenus* e *P. fasciculatus* registaram efeitos antitumorais muito potentes. Assim como também foi feito um rastreio de um total de 26 extratos de *Plectranthus*, onde foram testados quanto a sua citotoxicidade em células da mama MDA-MB-231, observando bons resultados para o extrato acetônico de *P. madagascariensis*, e seus componentes que foram isolados e também testados, demonstraram resultados positivos (Garcia et al., 2018).

No geral, as atividades citotóxicas dos extratos e compostos derivados dos *Plectranthus* sugerem que a sua extensa diversidade química conduz a um amplo valor biológico, levando a uma alta demanda na exploração deste género, para outros compostos biologicamente ativos (Garcia et al., 2018).

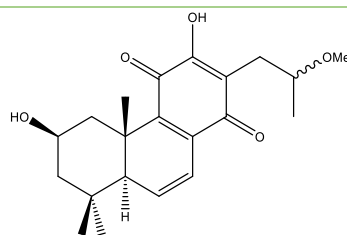
Várias classes de diterpenóides são encontradas no género *Plectranthus*, sendo a classe de diterpenos abietanos relatada como a principal. A sua bioatividade é amplamente descrita e a sua variedade de compostos é constituída por famílias diferentes, nomeadamente roileanonas, spirocoleons e quinonas, aos quais uma variedade de atividades está associada (Garcia et al., 2018).

Todos os diterpenos derivados dos *Plectranthus*, independentemente da citotoxicidade, até agora identificados em diversas espécies, estão apresentados na **Tabela 2** (Garcia et al., 2018).

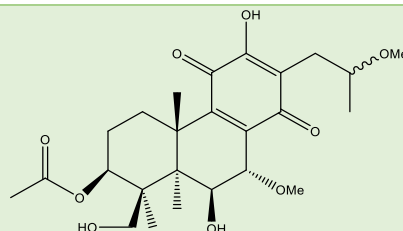
Tabela 2: Estrutura química dos vários diterpenos isolados a partir de várias espécies de *Plectranthus*

Diterpene	Chemical Structure of the Diterpene
7α-Acetoxy-6β-hydroxy-royleanone (1)	

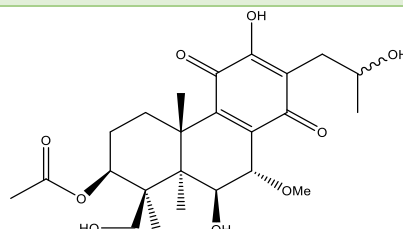
Plectranthroyleanone A
(2)



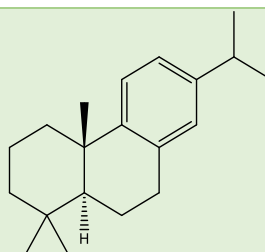
Plectranthroyleanone B (3)



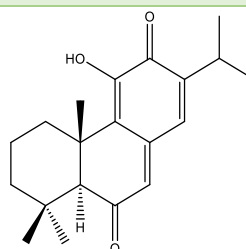
Plectranthroyleanone C (4)



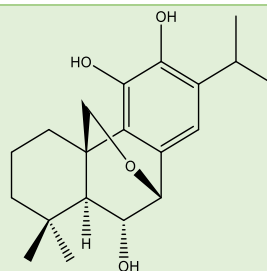
Dehydroabietane or abietatriene
(5)



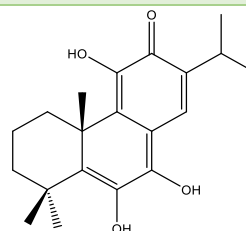
Taxodione
(6)



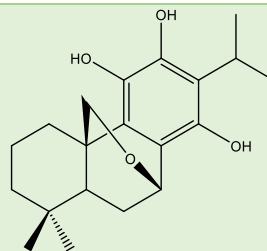
6 α ,11,12,-trihydroxy-7 β ,20-epoxy-8,11,13-abietatriene
(7)



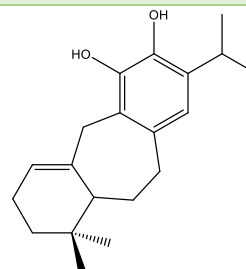
5,6-didehydro-7-hydroxy-taxodone
(8)



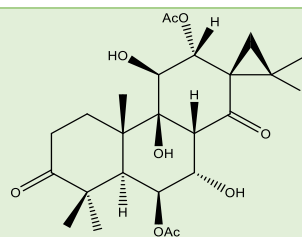
20-Deoxocarnosol
(9)



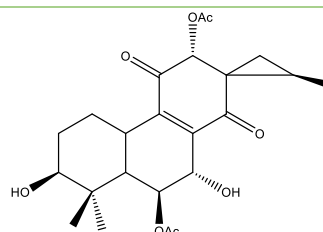
Barbatusol
(10)



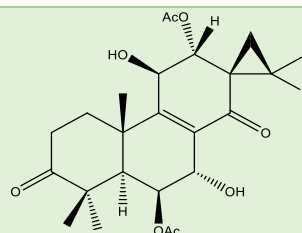
Cyclobutatusine
(11)



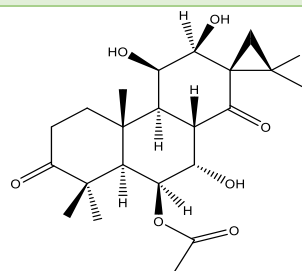
**3 β -hydroxy-3-deoxybarbatusin
(12)**



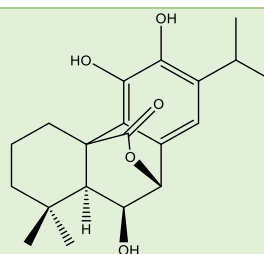
**Barbatusin
(13)**



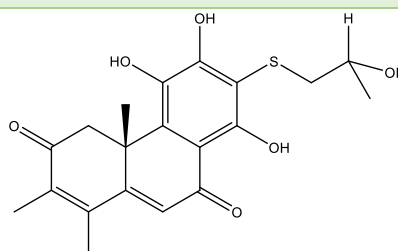
**7 β -acetyl-12-desacetoxy-cyclobutatusine
(14)**



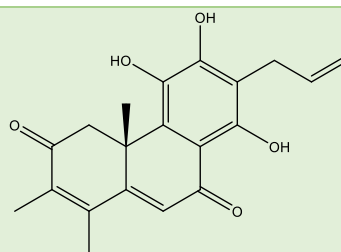
**6 β -hydroxicarnosol
(15)**



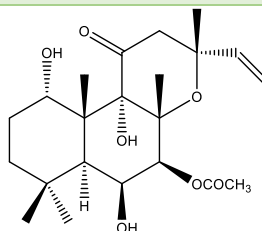
**Plectrinone A
(16)**



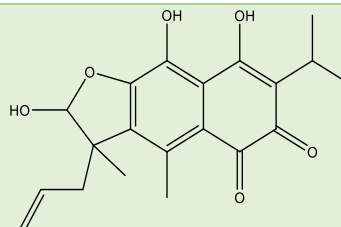
Plectrinone B
(17)



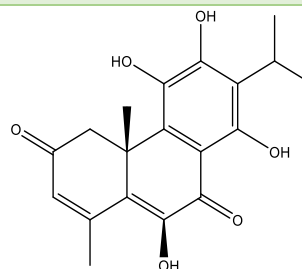
Forskolin
(18)



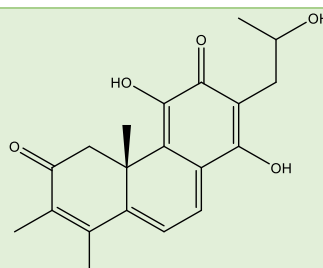
Coleon A
(19)



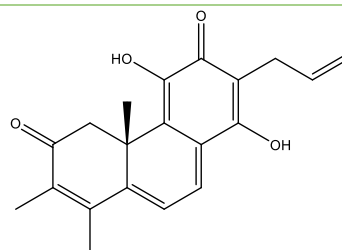
Coleon B
(20)



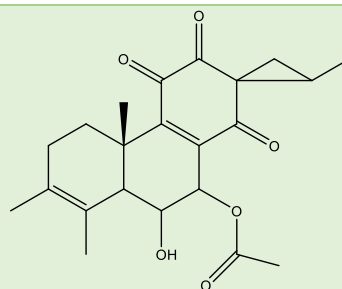
Coleon E
(21)



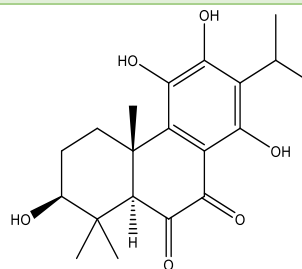
Coleon F
(22)



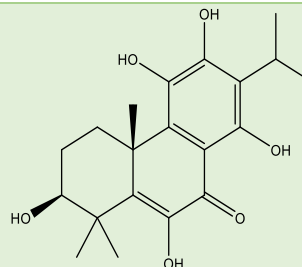
Coleon O
(23)



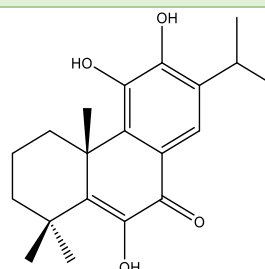
Coleon T
(24)



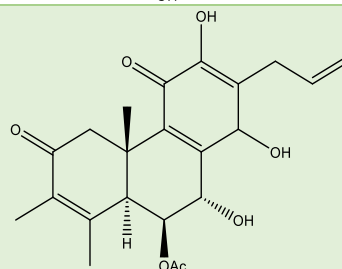
Coleon S
(25)



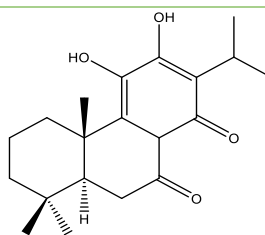
14-deoxycoleon U
(26)



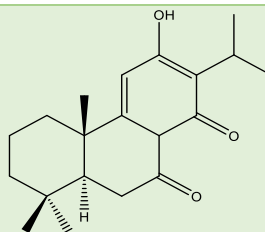
Plectranthone J
(27)



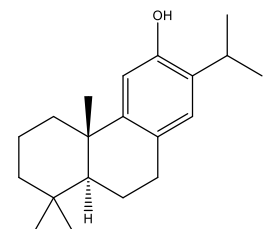
Demethylcryptojaponol or
11-hydroxysugiol
(28)



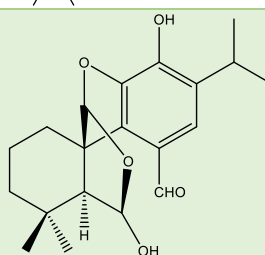
Sugiol
(29)



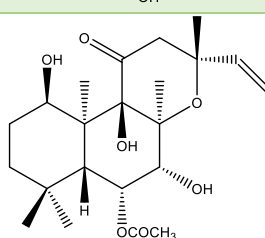
Ferruginol
(30)



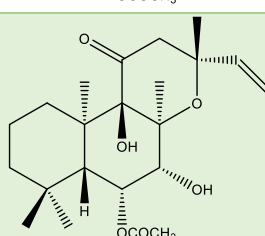
Cariocal
(31)



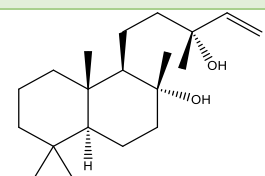
Isoforskolin
(32)



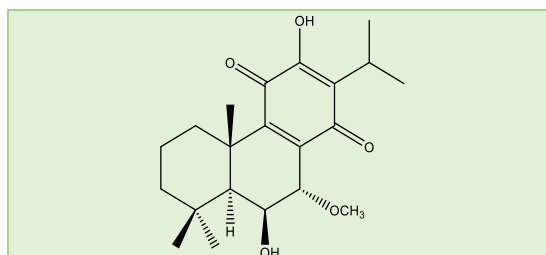
1-deoxyforskolin
(33)



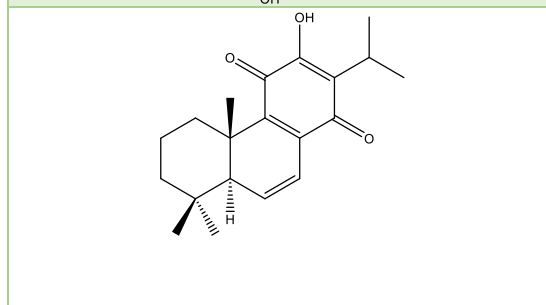
13-epi-sclareol
(34)



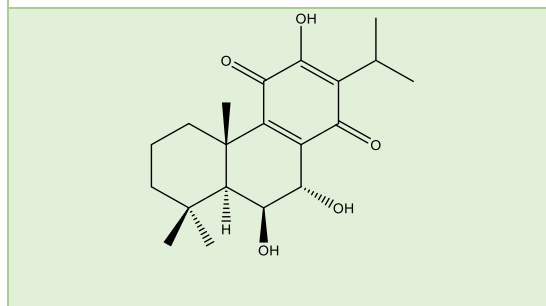
**6 β -hydroxy-7 α -methoxyroyleanone
(35)**



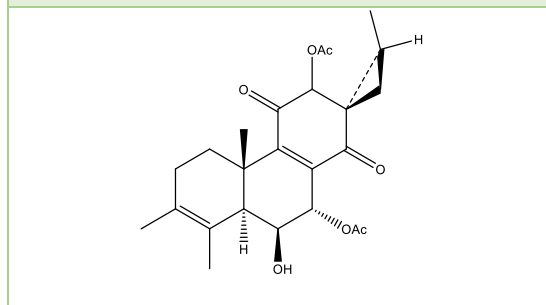
**6,7-Dehydroroyleanone
(36)**



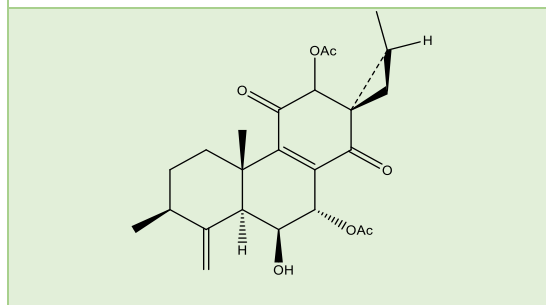
**6 β ,7 α -dihydroxyroyleanone
(37)**



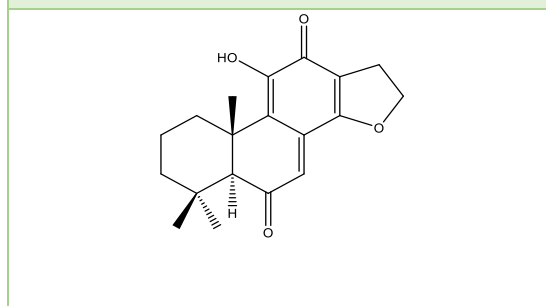
**Coleon M
(38)**



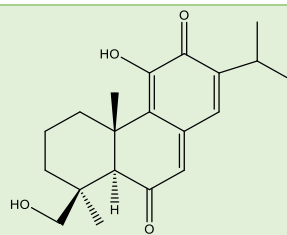
**Coleon N
(39)**



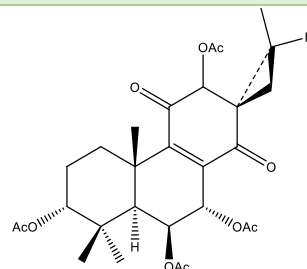
**Coleon P
(40)**



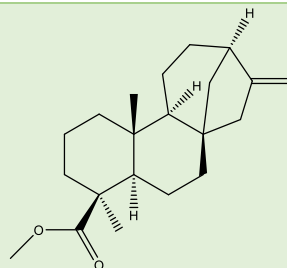
**Coleon Q
(41)**



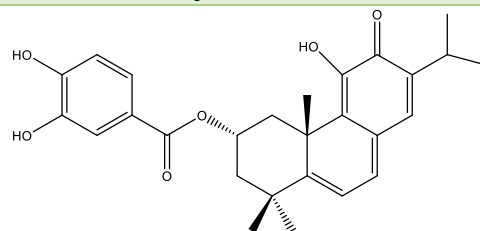
**Coleon R
(42)**



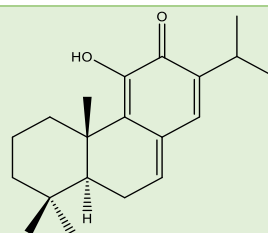
**Kaurenic acid
(43)**



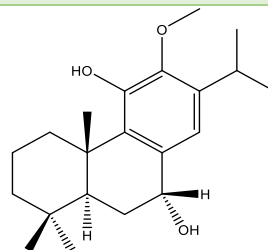
**Parvifloron F
(44)**



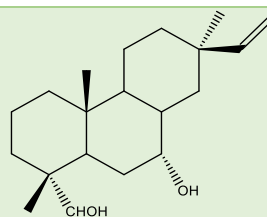
**11-Hydroxy-12-oxo-7,9(11),13-abietatriene
(45)**



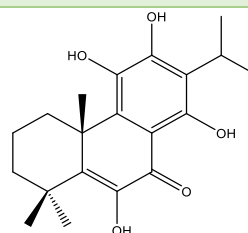
**7 α ,11-dihydroxy-12-methoxy-8,11,13-abietatriene
(46)**



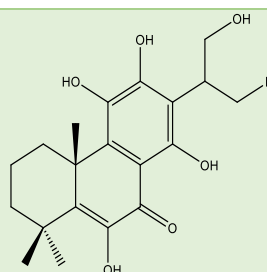
7 α ,18-dihydroxy-isopimara-8(14),15-diene
(47)



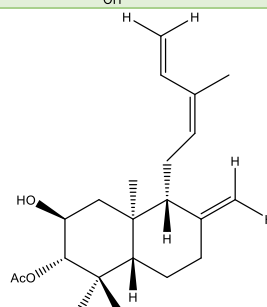
Coleon U
(48)



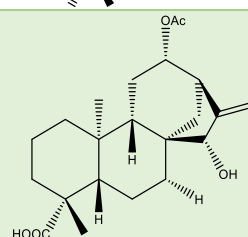
Coleon C
(49)



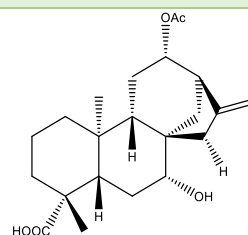
ent-3 β -acetoxylabda-8(17),12Z,14-trien-
2 α -ol
(50)



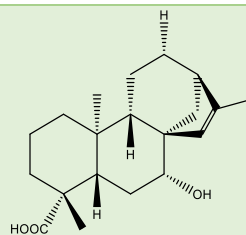
ent-12 β -acetoxylabda-8(17),12Z,14-trien-
19-oic acid
(51)



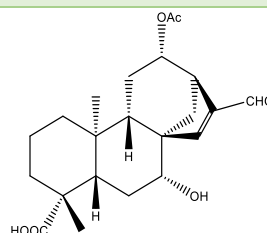
ent-12 β -acetoxylabda-8(17),12Z,14-trien-
19-oic acid
(52)



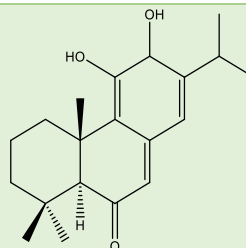
ent-7 β -hydroxykaur-15-en-19-oic acid
(53)



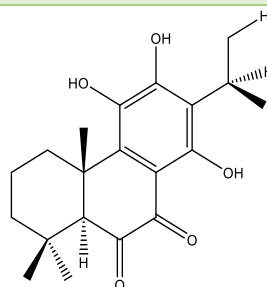
ent-12 β -Acetoxy-17-oxokaur-15-en-19-oic acid (54)



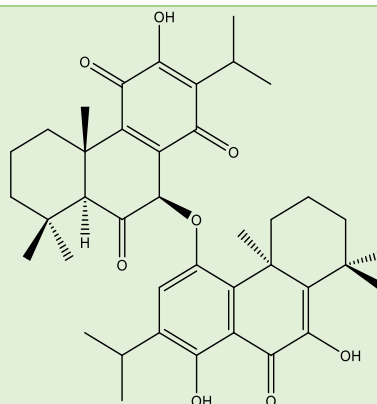
14-hydroxytaxodione
(55)



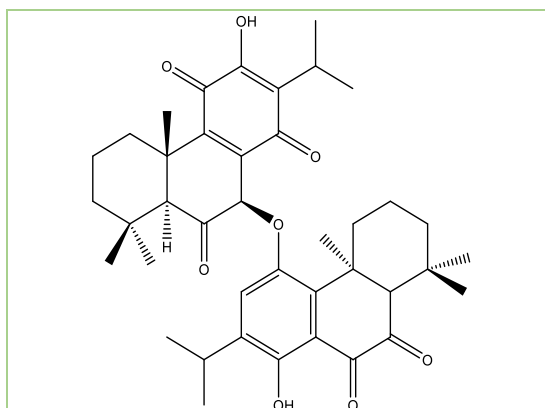
Coleon V
(56)



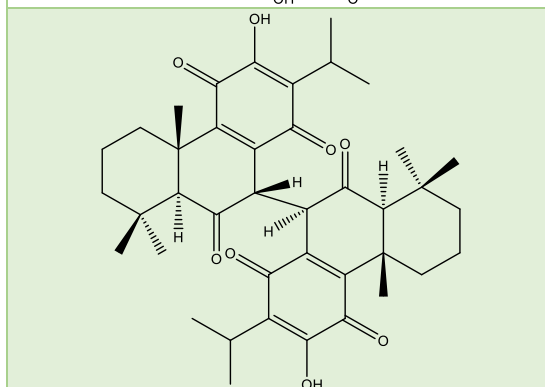
Grandidone A
(57)



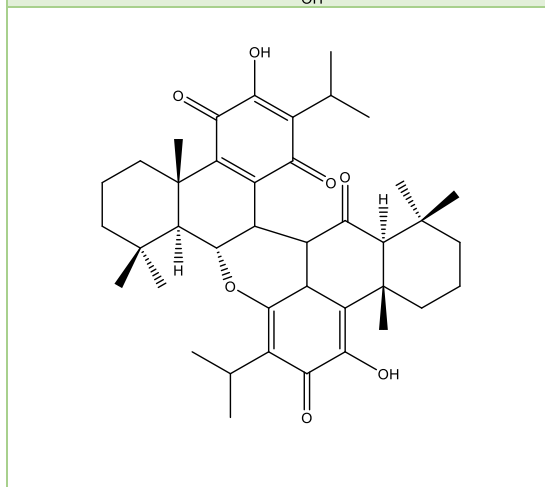
Grandidone B
(58)



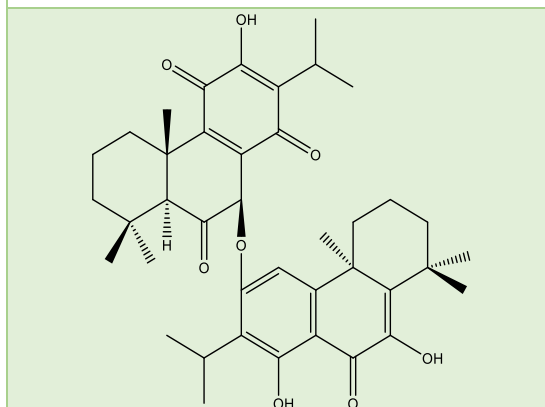
Grandidone C
(59)



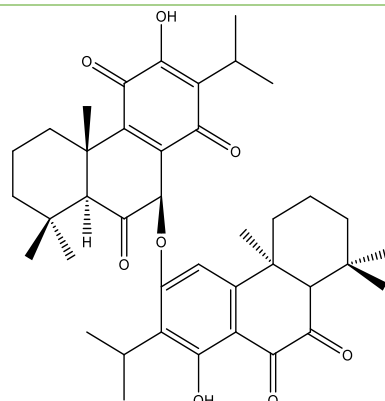
Grandidone D
(60)



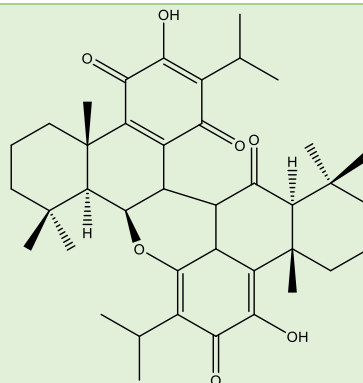
7-Epigrandidone A
(61)



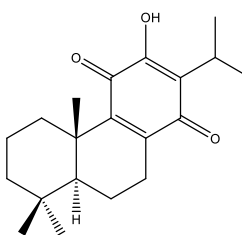
7-Epigrandidone B
(62)



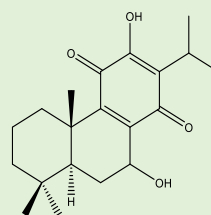
7-Epigrandidone D
(63)



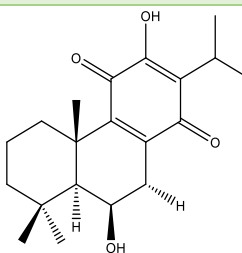
Royleanone
(64)



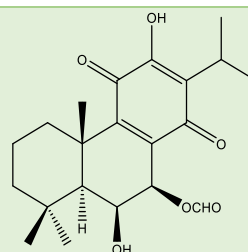
Horminone
(65)



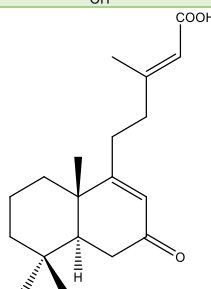
6 β -hydroxyroyleanone
(66)



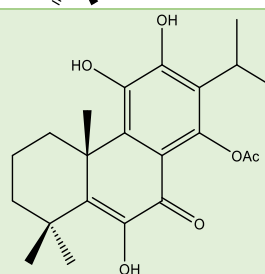
**7 β -formyloxy-6 β -hydroxyroyleanone
(67)**



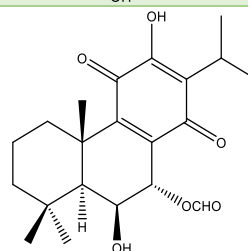
**Rhinocerotin acid
(68)**



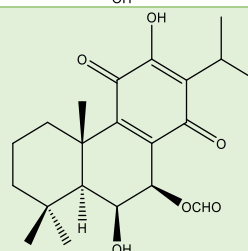
**14-O-acetylcoleon U
(69)**



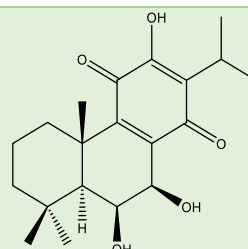
**7 α -formyloxy-6 β -hydroxyroyleanone or
7 α -formyloxy-6,12-dihydroxy-abieta-8,12-
diene-11,14-dione
(70)**



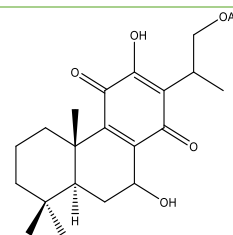
**7 β -acetoxy-6 β -hydroxyroyleanone or
7 α -acetoxy-6,12-dihydroxy-abieta-8, 12-
diene-11,14-dione
(71)**



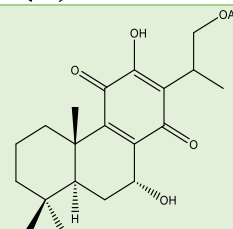
**6 β ,7 β -dihydroxy-royleanone
(72)**



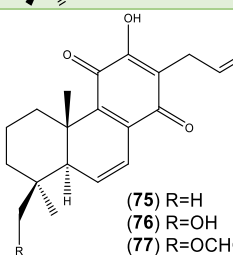
16-acetoxyhorminone
(73)



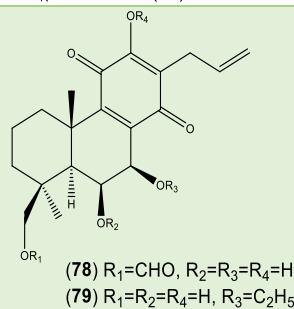
16-acetox-7 α -hydroxyroyleanone
(74)



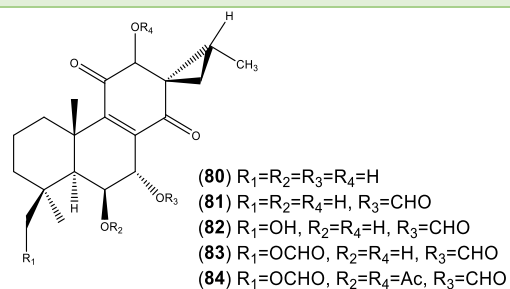
Lanugones A (75)
Lanugone B (76)
Lanugone C (77)



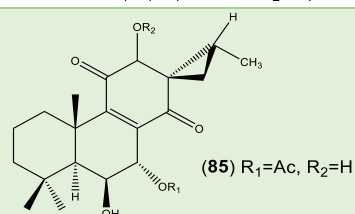
Lanugones D (78)
Lanugone E (79)



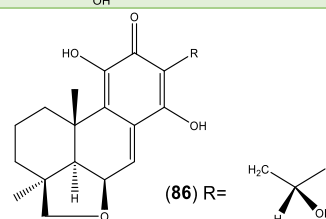
Lanugones F (80)
Lanugone G (81)
Lanugone H (82)
Lanugone I (83)
Lanugone J (84)



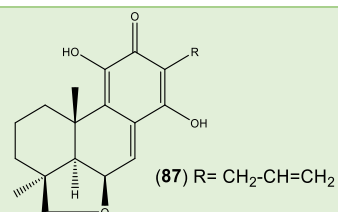
Lanugones K (85)



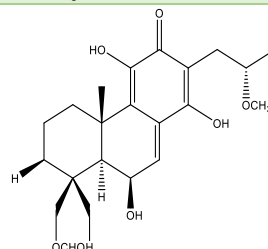
Lanugone L (86)



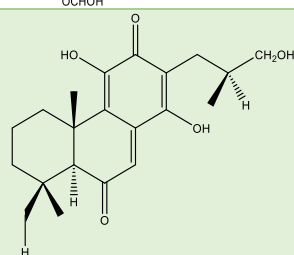
Lanugone M (87)



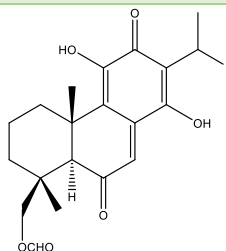
Lanugone N (88)



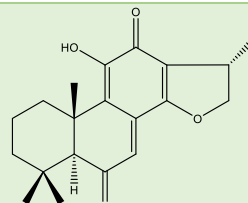
Lanugone O (89)



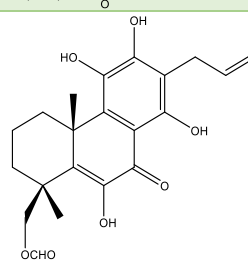
Lanugone P (90)



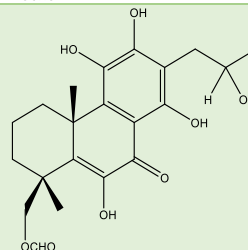
Lanugone Q (91)



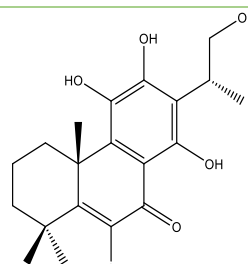
Lanugone R (92)



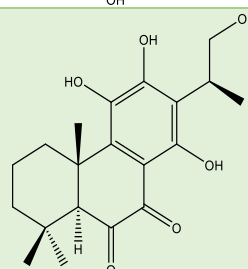
Lanugone S (83)



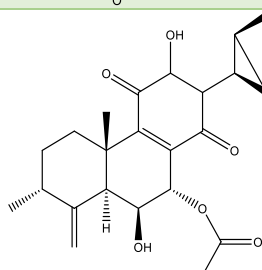
(15S)-Coleon C
(94)



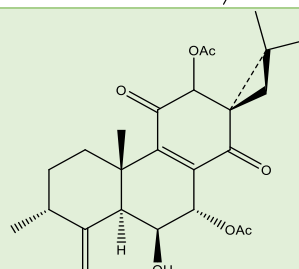
(15S)-Coleon D
(95)



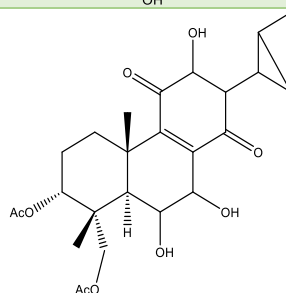
Coleon G
(96)



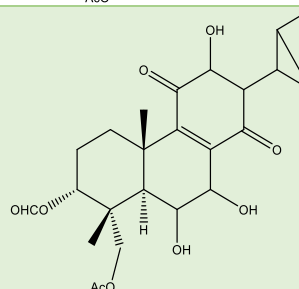
Coleon J
(97)



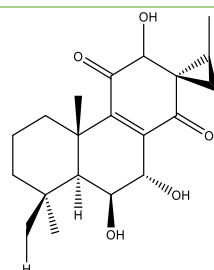
Coleon Y
(98)



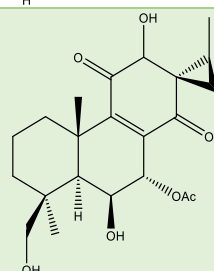
3-O-desacetyl-3-O-formyl-coleon Y
(99)



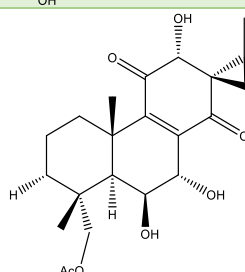
12-O-desacetyl-coleon Q or
15-epilanugon F
(100)



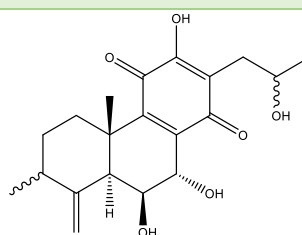
7-O-acetyl-12-O-desacetyl-19-hydroxy-
coleon Q
(101)



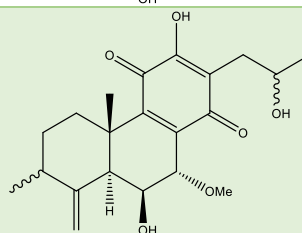
18-acetoxy-12-O-desacetyl-coleon Q
(102)



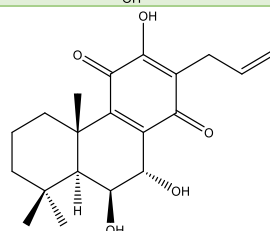
bis(abeo)-royleanone
(103)



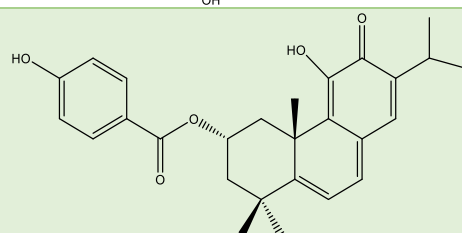
di-abeo-7 α -methoxy-royleanone
(104)



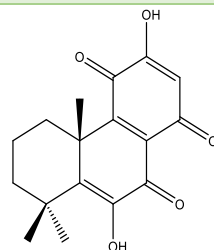
6 β ,7 α -dihydroxy(allyl)royleanone
(105)



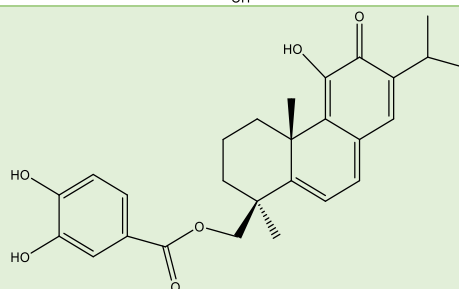
Parvifloron D
(106)



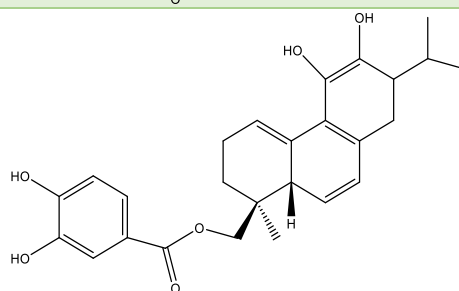
**Coleon-U-quinone
(107)**



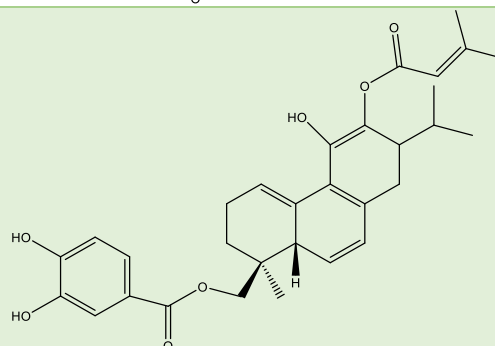
**Parviflorone E
(108)**



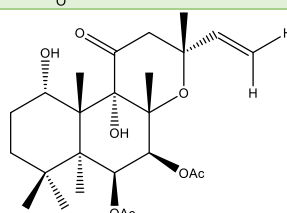
**Plectranthol A
(109)**



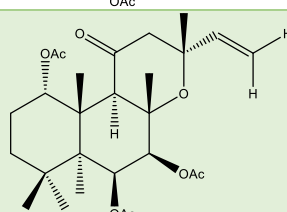
**Plectranthol B
(110)**



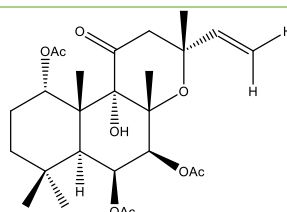
**6-O-acetylforskolin
(111)**



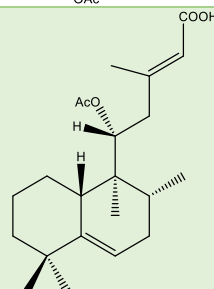
**1,6-di-O-acetyl-9-deoxyforskolin
(112)**



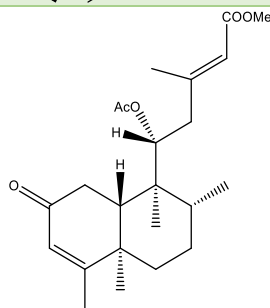
1,6-di-O-acetylforskolin
(113)



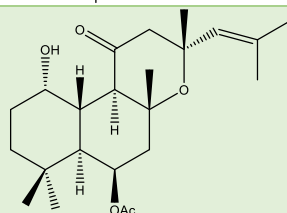
11R*-acetoxymalima-5,13E-dien-15-oic acid
(114)



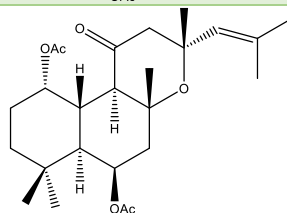
Plectornatin A
(115)



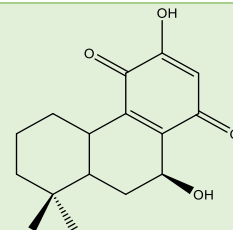
Plectornatin B
(116)



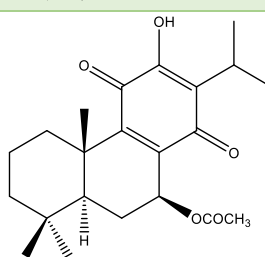
Plectornatin C
(117)



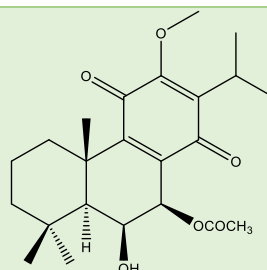
Taxoquinone or
7β-hydroxy-royleanone
(118)



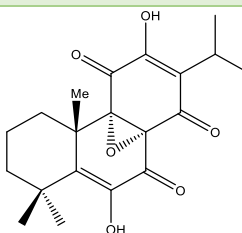
7β-acetoxy-royleanone
(119)



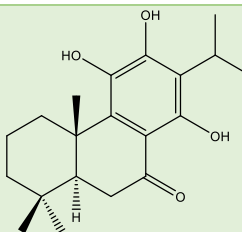
7 β -acetoxy-6 β -hydroxy-12-O-methyl-royleanone
(120)



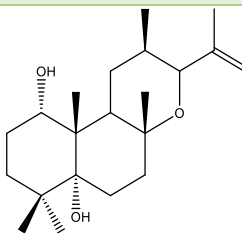
8 α ,9 α -epoxycoleon-U-quinone
(121)



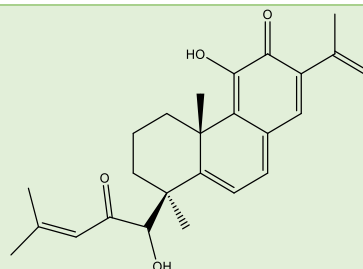
Demethylinuroyleanol
(122)



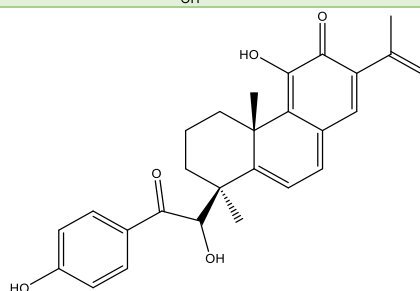
1 α ,5 α -dihydroxymanoyl oxide
(123)



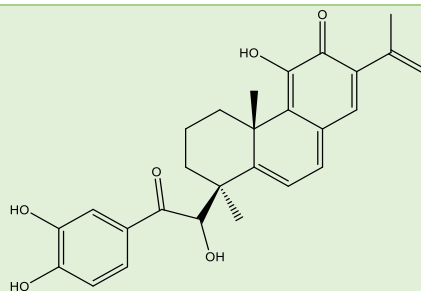
11-hydroxy-19-(methyl-buten-2-oyloxy)-abieta-5,7,9(11),13-tetraene-12-one
(124)



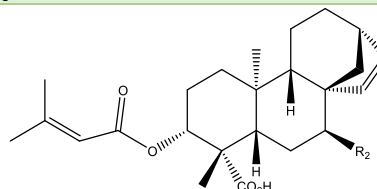
11-hydroxy-19-(4-hydroxy-benzoyloxy)-abieta-5,7,9(11),13-tetraene-12-one
(125)



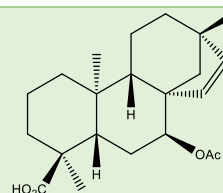
11-hydroxy-19-(3,4-dihydroxybenzoyloxy)-
abieta-5,7,9(11),13-tetraene-12-one
(126)



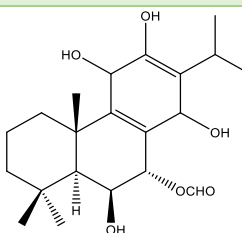
ent-3 β -(3-methyl-2-butenoyl)oxy-15-
beyeren-19-oic acid
(127)



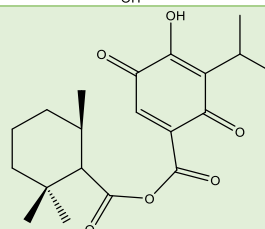
ent-7 α -acetoxy-15-beyeren-18-oic acid
(128)



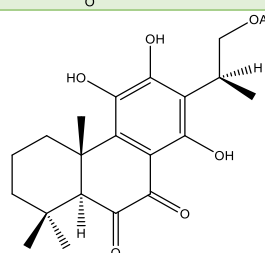
7 α -formyloxy-6 β -hydroxyroyleanone
(129)



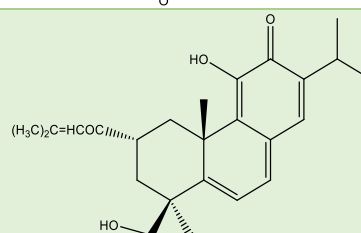
Sanguinone A
(130)



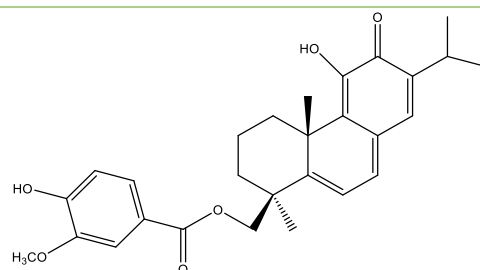
16-O-acetylcoleon D
(131)



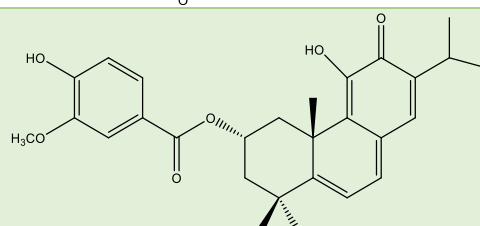
Parvifloron A
(132)



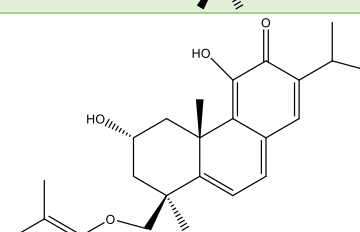
Parvifloron B
(133)



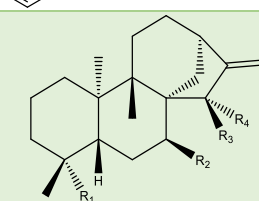
Parvifloron G
(134)



Parvifloron H
(135)

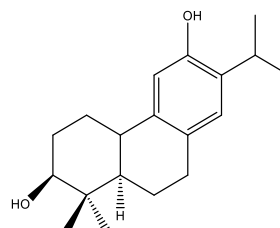


ent-16-kauren-19-ol (136)
ent-16-kauren-19-oic (137)
xylopic acid (138)
xylopinic acid (139)

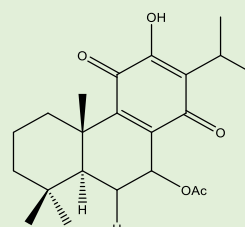


(136) $R_1=CH_2OH$, $R_2=R_3=R_4=H$
(137) $R_1=COOH$, $R_2=R_3=R_4=H$
(138) $R_1=COOH$, $R_2=R_3=H$, $R_4=OAc$
(139) $R_1=COOH$, $R_2=OAc$, $R_3=R_4=O$

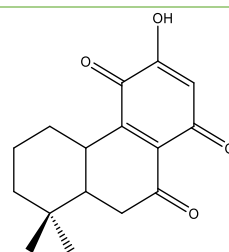
Hinokiol (140)



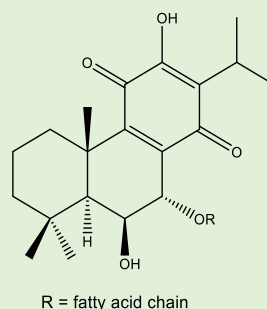
7 α -acetoxyroyleanone
(141)



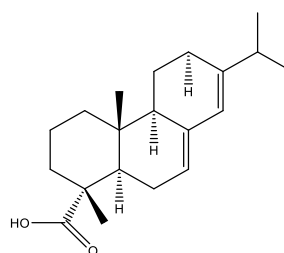
7-oxoroyleanone
or 7-ketoroyleanone
(142)



7 α -acyloxy-
6 β -Hydroxyroyleanone
(143)



Abietic acid
(144)



Neste estudo, são avaliadas diversas atividades biológicas de extratos de seis espécies de *Plectranthus*, nomeadamente, *Plectranthus swynnertonii* S. Moore (**Figura 2**), *P. Welwitschii* (Briq. Codd) (**Figura 3**), *P. woodii* Gürke (**Figura 4**), *P. cylindraceus* Hochst, ex Benth (**Figura 5**), *P. spicatus* E. Mey ex Benth. (**Figura 6**) e *P. petiolaris* E. Mey ex Benth (**Figura 7**), que de acordo com as várias referências consultadas, as informações científicas sobre as mesmas são bastante escassas, tanto em relação aos seus usos etnobotânicos como em estudos fitoquímicos, com a exceção do *P. cylindraceus* Hochst, ex Benth.

Além dos seus usos etnobotânicos, os *Plectranthus* são notórios na horticultura, como nos jardins, rochedos e bonsai, na floricultura ao produzirem flores muito atraentes e resistentes a pragas e no uso doméstico, sendo usado na culinária, como repelente de moscas e aromático, como é possível observar na **Tabela 3** (Rice et al., 2011).

Figura 2: *P. swynnertonii*Figura 3: *P. welwitschii*Figura 4: *P. woodii*Figura 5: *P. cylindraceus*Figura 6: *P. spicatus*Figura 7: *P. petiolaris*Tabela 3: Usos Hortícolas e Domésticos das plantas *Plectranthus* spp. em estudo

<i>Espécies</i>	Nome da espécie com autoridade e sinónimo recente	Usos Hortícolas / Usos Domésticos	Referência
<i>Plectranthus cylindraceus</i> (P.cy)	<i>Plectranthus cylindraceus</i> Hochst. ex Benth.	Cestas de suspensão Jardins Bushveld	Van Jaarsveld, 1987, 2006 Pooley (1998)
<i>Plectranthus petiolaris</i> (P. pet)	<i>Plectranthus petiolaris</i> E. Mey. ex Benth.	Jardins Bushveld Cobertura do solo / Aromático	Van Jaarsveld (2006) Pooley (1998)
<i>Plectranthus spicatus</i> (P. sp)	<i>Plectranthus spicatus</i> E. Mey. ex Benth.	Jardins Bushveld	Pooley (1998) Van Jaarsveld (2006)
<i>Plectranthus swynnertonii</i> (P. swy)	<i>Plectranthus swynnertonii</i> S. Moore	Jardins Florestais Cobertura do solo	Van Jaarsveld (2006)

Pesquisa de atividade biológica de extratos de seis espécies de Plectranthus: P. cylindraceus, P. petiolaris, P. spicatus, P. swynnertonii, P. Welwitschii e P. woodii

<i>Plectranthus Welwitschii</i> (P. wel)	<i>Plectranthus Welwitschii</i> (Briq. Codd)	Sem Dados	Sem Dados
<i>Plectranthus woodii</i> (P. woo)	<i>Plectranthus woodii</i> Gürke <i>Plectranthus hadiensis</i> (Forssk.) Schweinf. ex Spreng. var. <i>woodii</i> (Gürke) Codd	Jardins ornamentais	Van Jaarsveld (2006)

2. SECÇÃO EXPERIMENTAL

2.1. Reagentes

Acetona; dimetilsulfóxido (DMSO); 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH); Quercetina; ácido 5,5'ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB); Acetilcolinesterase (AChE) e Iodeto de acetilcolina obtido pela Sigma. Tacrina, Tampão HEPES (50 mM, pH 8,0) e Reagente de Ellman (Fluka Chemie AG). Agar Mueller-Hinton e Sabouraud Dextrose foram obtidos pelo Biokar Diagnostics. Vancomicina; Norfloxacin; Nistatina; Butil hidroxitolueno (BHT) e o metanol foram obtidos pela Sigma. Sal *Artemia* JBL e Ovos de *Artemia* JBL foram obtidos pela JBL GmbH e Co. KG, D-67141 Neuhofen Alemanha.

2.2. Equipamento

Papel de filtro (Whatman Nº5, Inc., Clifton, NJ, USA), Evaporador rotativo (K Ika-WERKE, GMBH \$ CO.KG; D-79219 staufen Alemanha), Aparelho de ultrassons da VWR, Espectrofotómetro U-1500 Hitachi Instruments, Inc USA., Microscópio ótico (Æ, CETI Bélgica), Microplacas de 96 poços (TECAN Infinite M200, Mannedorf, Suíça), Bomba de ar de aquário (HI-FLOTM Single Type 4000), Armário com termóstato AQUA LYTIC®, Silica gel de TLC 60F254 20x20 (Merck KGaA) e Bico de Bunsen.

2.3. Material Vegetal

Todo o material das seis espécies de plantas estudadas para a elaboração deste trabalho, nomeadamente, *Plectranthus swynnertonii* S. Moore, *P. welwitschii* (Briq. Codd), *P. woodii* Gürke, *P. cylindraceus* Hochst, ex Benth, *P. spicatus* E. Mey ex Benth. e *P. petiolaris* E. Mey ex Benth, cresceram no Parque Botânico da Tapada da Ajuda, provenientes de porções de caules vindos do “Kirstenbosch National Botanical Gardens”, África do Sul, e foram recolhidos entre 2007 e 2008, sempre em Junho e Setembro, e várias espécies foram plantadas no Herbário “João de Carvalho e Vasconcelos” do “Instituto Superior de Agronomia”, Lisboa (LISI), Portugal.

2.4. Microrganismos

Escherichia coli ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Candida albicans* ATCC 10231, obtidas de “American Type Culture Collection” (ATCC).

2.5. Preparação dos extratos

Muitas espécies de *Plectranthus* têm se mostrado com grande potencial a nível das suas atividades biológicas. Apesar de ainda existir uma grande necessidade de pesquisa, para que haja a validação científica das mesmas e melhor entendimento das suas propriedades farmacológicas, pode-se dizer que é uma área que vem se mostrando bastante promissor (Rice et al., 2011).

Antes de iniciar qualquer ensaio para avaliar a atividade biológica dos extratos das seis espécies de *Plectranthus*, fez-se a preparação dos mesmos, utilizando o método de extração por ultrassons (10 % (m/v)). Para tal, adicionou-se 30 mL de acetona (solvente extrator) a 3 g de folhas trituradas de planta seca, seguido de ultrassom, onde foi feita a extração com a duração de 1 hora. Para cada extrato, foram realizadas três extrações.

Ao fim de cada extração, filtrou-se o conteúdo extraído para um balão de fundo redondo, usando um papel de filtro (Whatman N° 5 paper, Inc., Clifton, NJ, USA), obtendo no fim, para cada extrato, o conteúdo total das três extrações, que de seguida foram evaporados usando o evaporador rotativo à 40-50 °C. Os conteúdos extraídos foram depois dissolvidos em DMSO a uma concentração de 10 mg/mL, e posteriormente, colocados em Eppendorfs.

O rendimento de extração foi determinado para cada um dos extratos, de acordo com a **Equação 1**. Os resultados foram expressos em percentagem de rendimento de extração (%) para cada um dos extratos testados.

$$\text{Equação 1: } \% \text{ Rendimento (m/m)} = 100 \times \frac{\text{Residuo seco (g)}}{\text{Planta seca (g)}}$$

2.6. Atividade antioxidante

O oxigénio é essencial e indispensável a vida aeróbia, assim como um poderoso oxidante (Duarte-Almeida, José, Genovese, & Lajolo, 2006; Hasan et al., 2009). Os seus radicais livres como o hidroxila (OH•), o superóxido (O₂•-), o óxido nítrico (NO•) e o lipídico piróxilo ((LOO•), são muito importantes para o corpo humano, no entanto, quando há a produção excessiva dos mesmos, estes podem afetar seriamente o nosso organismo podendo levar a consequências graves como a doença isquémica cardíaca, diabetes, aterosclerose, cancro,

neurodegenerativas (Alzheimer), entre outros (Duarte-almeida et al., 2006; Hasan et al., 2009).

Para avaliar a capacidade de recaptação de radicais livres dos extratos, foi usado o método do DPPH (2,2-difenil-1-1-picrilhidrazila) (Rijo et al., 2014). O método de DPPH é bastante usado devido a ser considerado um método rápido, simples, preciso e muito sensível (Oliveira, 2015).

Inicialmente, á fim de determinar qual o controlo positivo a ser usado neste ensaio, nomeadamente, quercetina ou BHT, calculou-se a atividade antioxidante das mesmas. A atividade antioxidante foi calculada de acordo com a **Equação 2**.

$$\text{Equação 2: AA (\%)} = 100 \times \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{amostra}}}{A_{\text{DPPH}}}$$

2.6.1. DPPH – Ensaio qualitativo

A atividade antioxidante dos extratos foi qualitativamente determinada utilizando o ensaio de radical DPPH em TLC, usando como controlo positivo a quercetina 1 mg/mL em acetona, sendo que esta tem atividade antioxidante comprovada, e como controlo negativo optou-se por usar a acetona, em vez de DMSO, sendo que a acetona não tem nenhuma atividade antioxidante, enquanto que o DMSO tem alguma atividade antioxidante, o que poderia originar falsos positivos.

Para a realização do ensaio, dividiu-se a placa de TLC em oito quadrados, sendo que seis destes quadrados, foram para os extratos em estudo e os outros dois quadrados, para os controlos positivo e negativo. Em cada um dos seis quadrados aplicou-se 10 µL do extrato correspondente (1 mg/mL em acetona), no controlo positivo 10 µL de quercetina e no controlo negativo aplicou-se 10 µL de acetona.

A placa de cromatografia (TLC) foi pulverizada com DPPH e o resultado esperado é de aparecer uma mancha amarela, no local da aplicação do extrato e no controlo positivo, o que significa que os mesmos apresentam a capacidade de reduzir o radical DPPH (Rijo et al., 2012). A molécula de DPPH é considerada um radical orgânico livre estável, apresentando boa estabilidade na ausência de luz, assim como viabilidade e simplicidade (Oliveira, 2015).

Porém, quando o radical DPPH recebe a transferência de um eletrão a partir do composto antioxidante, este perde a sua cor violeta, para amarelo ou violeta bem claro,

resultando numa diminuição da absorvência do mesmo, que pode ser monitorizada quantitativamente através do espectrofotómetro UV/visível (Hasan et al., 2009).

Quanto mais intensa for a mancha amarela, maior é a atividade antioxidante do composto (Rijo et al., 2012).

2.6.2. DPPH – Ensaio quantitativo

Para a realização do ensaio quantitativo, foram adicionados 10 µL de extrato de planta (amostra) a 990 µL de solução de DPPH (0,002% em metanol), sendo este ter sido realizado em triplicado, para cada extrato, assim como para o controlo positivo.

As misturas foram incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente e, de seguida, a absorvência foi medida no espectrofotómetro à 517 nm, contra o correspondente branco. A atividade antioxidante de cada extrato e do controlo positivo, foi calculada de acordo com a **Equação 2**, em que AA (%) é a atividade antioxidante, A DPPH é a absorvência do DPPH contra o branco e A amostra é a absorvência do extrato ou controlo positivo contra o branco.

Os extratos foram testados a uma concentração final de 10 µg/mL.

2.7. Atividade antimicrobiana – Método de difusão em poços

Para testar a atividade antimicrobiana de cada extrato preparado, foi usado o método de difusão em poços, em que, cada extrato foi avaliado contra seis espécies bacterianas e leveduras, nomeadamente *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 e *Candida albicans* ATCC 10231.

Os extratos preparados anteriormente, foram reconstituídos em DMSO a uma concentração de 1 mg/mL, assim como as soluções stock dos antibióticos de referência, nomeadamente, a vancomicina, a norfloxacin e a nistatina, que foram também preparadas a uma concentração de 1 mg/mL em DMSO.

Como controlo negativo, foi usado o DMSO e para os controlos positivos foram usados a vancomicina para bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*), a norfloxacin para bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e nistatina para fungos e leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*).

As caixas de Petri que continham 20 mL de meio de cultura de Agar Mueller-Hinton sólido e Sabouraud Dextrose (para as leveduras) foram inoculadas com 0,1 mL de suspensão bacteriana de acordo com a escala 0,5 da solução de McFarland e a suspensão foi uniformemente espalhada na superfície do meio usando uma zaragatoa. Em seguida, foram feitos poços com aproximadamente 5 mm de diâmetro no meio e foram colocados 50 µL de cada extrato nesses poços, assim como a mesma quantidade de controles positivo e negativo.

As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas e a atividade antimicrobiana foi avaliada, ao fim desse tempo, por medição do diâmetro (mm) da zona de inibição formada à volta dos poços e comparando-os com o diâmetro dos controles observados.

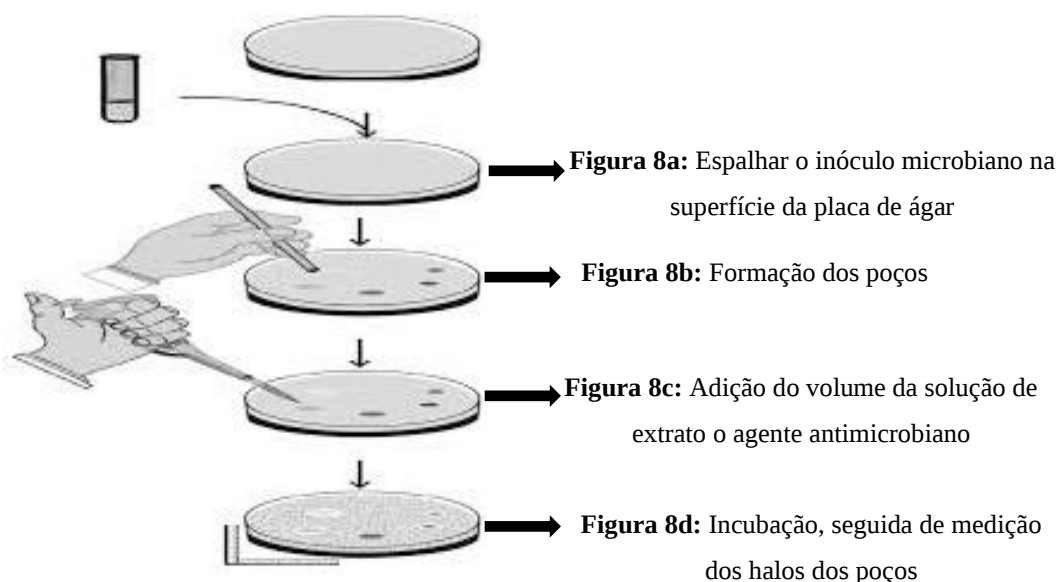


Figura 8: Procedimento da avaliação da atividade antimicrobiana usando o método de difusão em poços

2.8. Atividade *in vitro* da inibição da acetilcolinesterase

A atividade enzimática da acetilcolinesterase foi avaliada tendo em conta o método de Ellman descrito por Rijo et al. (2014a), usando um leitor de microplacas.

O método de Ellman, porém, sofreu algumas alterações, usando a acetilcolina como substrato e o ácido 5,5'ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) como reagente de Ellman. Como controles positivo e negativo, usou-se a Tacrina e uma amostra de solvente, respetivamente.

Numa placa de 96 poços, fez-se uma mistura de tampão HEPES (50 mM, pH 8,0), solução de amostra (30 µL) e enzima. AChE (0,5 U / mL), que posteriormente foi incubada durante 15 minutos à 25 °C (**Figura 9**).

A reação apenas deu início, após a adição de acetiltiocolina (1,20 mM) e DTNB (3,03 mM). A hidrólise da acetiltiocolina foi monitorizada, a cada 30 segundos durante 3 min, pela formação de anião 5tio-2 nitrobenzoato amarelo como resultado da reação do DTNB com a tiocolina, produzida pela hidrólise enzimática da acetiltiocolina, com um comprimento de onda de 405 nm, usando um leitor de placas de microplacas de 96 poços (TECAN Infinite M200, Mannedorf, Suíça).

O ensaio foi realizado em triplicado.

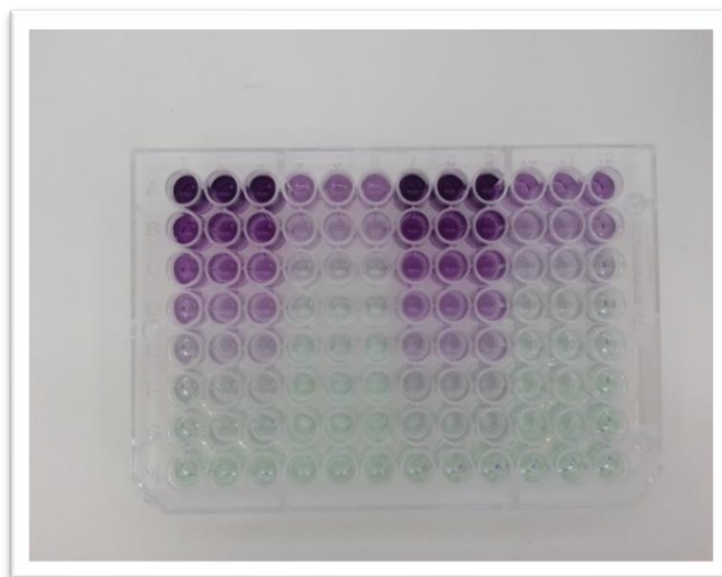


Figura 9: Placa de 96 poços usada para realizar o ensaio *in vitro* da inibição da acetilcolinesterase – Método de Ellman

A percentagem de inibição da atividade de AChE foi obtida a partir da expressão: $100 - (V_i / V_o \times 100)$, onde **Vi** é a taxa inicial calculada na presença de inibidores e **Vo** é a atividade enzimática (**Equação 3**).

A **Vi** e a **Vo**, que correspondem a velocidade de reação do inibidor e velocidade da reação controlo, respetivamente, são calculadas de acordo com a **Equação 4**.

Equação 3:

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

Equação 4:

$$\text{Velocidade da reação do controlo ou inibidor} = \left(\frac{\text{Absorvência corrigida (nm)}}{\text{Tempo (mn)}} \right)$$

2.9. Ensaio de toxicidade geral em *Artemia salina* L

Com o objetivo de avaliar a toxicidade geral dos diferentes extratos, foi realizado um teste de toxicidade geral usando o modelo de *Artemia salina* L (Meyer et al., 1982). Antes de iniciar este ensaio colocou-se a *Artemia* a crescer em água salgada artificial, tendo em conta determinadas condições como, a agitação que deve manter-se constante e uma temperatura amena.

O crescimento das *Artemias* foi monitorado até que se tivesse uma quantidade de *Artemias* vivas suficiente para proceder ao ensaio. Sendo que os extratos usados para realizar este ensaio, encontravam-se diluídos em DMSO, avaliou-se qual a melhor concentração de DMSO a ser usado, para que este tenha a capacidade de matar as *Artemias*. Foram realizados vários ensaios com DMSO, em diversas concentrações (1 mg/mL – 0,0001 mg/mL) e determinou-se a % de *Artemias* mortas, usando assim, a concentração de 0,1 mg/ml, que é onde se observou uma % intermédia de *Artemias* mortas.

Posteriormente, iniciou-se a realização do ensaio, em que no interior de cada poço da placa, adicionou-se o maior número de *Artemias salinas* vivas, evitando ao máximo os ovos. A solução salina foi preparada misturando 500 mL de água da torneira com três colheres de sal, sendo esta, de seguida, colocada nos poços juntamente com *Artemias*, servindo como uma espécie de controlo.

Para testar os extratos, foram adicionados em cada poço, 900 µL da solução com *Artemias salinas* á 100 µL de extrato a uma concentração de 0,1 mg/mL, e após 24 horas contabilizou-se o nº de mortes de *Artemias Salinas* (este número corresponde aos Náuplios mortos pelo extrato). Depois juntou-se as soluções, 100 µL de Dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇ com uma concentração de 100 mg/mL) com o objetivo de matar toda a *Artemia* existente no poço e esperou-se alguns minutos, para que de seguida fosse possível contabilizar-se as *Artemias* mortas novamente (este número corresponde aos Náuplios totais).

A percentagem (%) de *Artemia salina* morta, por cada extrato, foi determinada de acordo com a **Equação 5**.

Equação 5: $\text{Concentração Letal (\%)} = \frac{\text{Náuplios Totais} - \text{Náuplios Vivos}}{\text{Náuplios Totais}}$

Os extratos considerados ativos (acima dos 40 %) foram testados novamente á concentrações de 0,1, 0,5 e 1 ppm e o número de náuplios mortos foram registados e usados posteriormente para determinar a concentração mínima de extrato capaz de matar 50 % dos organismos vivos considerados (CL₅₀). Os valores de CL₅₀ iguais ou inferiores a 1 ppm foram considerados ativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Rendimento da extração por ultrassons

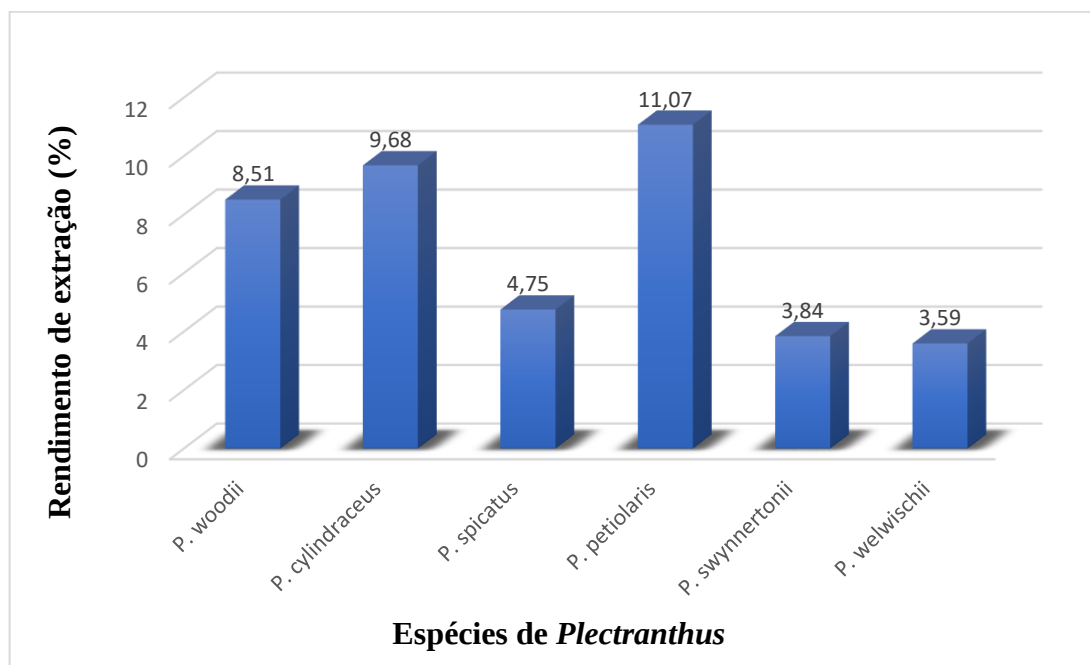
Neste trabalho, seis espécies de *Plectranthus* foram estudadas, nomeadamente, *Plectranthus swynnertonii* S. Moore, *P. welwitschii* (Briq. Codd), *P. woodii* Gürke, *P. cylindraceus* Hochst, ex Benth, *P. spicatus* E. Mey ex Benth. e *P. petiolaris* E. Mey ex Benth., e os extratos secos de cada uma das plantas foram preparadas usando a acetona como solvente extrator.

O método de ultrassom foi utilizado para a realização da extração, tendo em conta a sua eficácia já comprovada, de acordo com Rijo et al. 2014a.

O rendimento de extração (%) de cada uma das seis espécies de *Plectranthus* está apresentada no **Gráfico 1**, sendo que o *P. petiolaris* teve o maior rendimento de extração (11,07 % m/m), seguido pelo *P. cylindraceus* (9,68 % m/m), enquanto que o *P. welwitschii* obteve o rendimento mais baixo (3,59 % m/m).

De acordo com Rijo et al. 2014, o rendimento da extração dos extratos é maior quando há maior rutura celular do seu material vegetal, possibilitando uma maior lixiviação dos componentes no solvente extrator.

Gráfico 1: Rendimento de extração (resíduo seco % m/m) das seis espécies de *Plectranthus*.



3.2. Atividade antioxidante pelo método de DPPH

A atividade antioxidante dos extratos de *Plectranthus* foi avaliada pelo método de DPPH. Inicialmente testou-se dois tipos de controlo positivo, nomeadamente, a quercetina e o BHT, com o objetivo de determinar qual dos compostos continha maior poder antioxidante e de acordo com a **Tabela 4**, observou-se que a quercetina possuía maior poder antioxidante (99,47 %), e, portanto, foi o escolhido para ser o antioxidante de referência para este ensaio.

Tabela 4: Dados relativos à atividade antioxidante dos controlos positivos, BHT e Quercetina - Ensaio quantitativo (DPPH)

Composto	Abs DPPH	Abs branco	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Média	Desvio-padrão	Absorvência corrigida	AA (%)
Quercetina	0,824	0,224	0,340	0,181	0,164	0,228	0,10	0,004	99,47
BHT	0,957	0,07	0,86	0,85	0,85	0,854	0,01	0,783	18,18

3.2.1. Ensaio qualitativo

Para determinar qualitativamente a atividade antioxidante dos extratos foi utilizado o ensaio de radical DPPH em TLC e todos os extratos estudados produziram resultados positivos, como é possível observar na **Figura 10**.

Visto que todos os quadrados apresentaram uma coloração amarela, assim como o controlo positivo, a quercetina, concluiu-se então, que todos os extratos de *Plectranthus* analisados têm alguma atividade antioxidante.

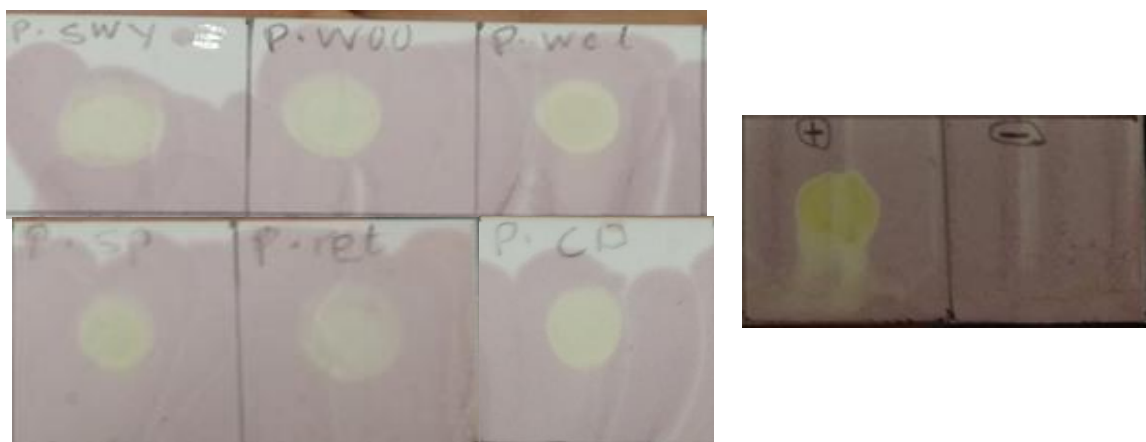


Figura 10: Resultado obtido da atividade antioxidante para os extratos analisados, assim como os controlos, positivo e negativo, quercetina e acetona, respetivamente, usando o método de DPPH - qualitativo

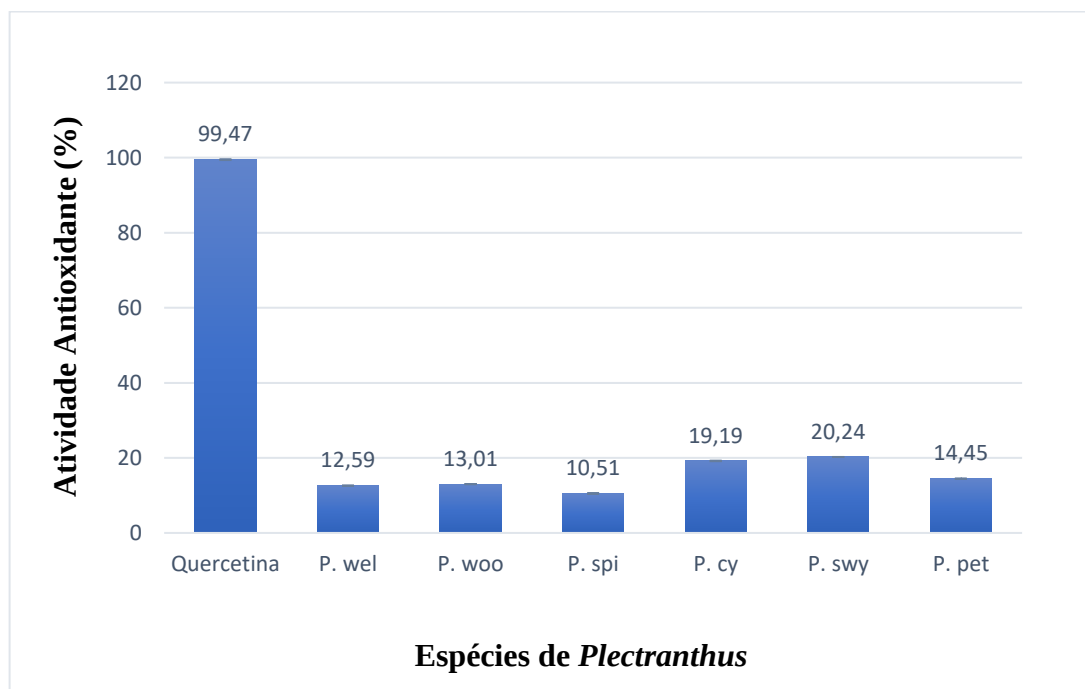
3.2.2. Ensaio quantitativo

As capacidades antioxidantes dos extratos orgânicos foram avaliadas mediante o método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH) e a diminuição na absorção da solução de DPPH seguida da adição de um antioxidante, foi medida no espectrofotômetro à 517 nm.

Após a medição da absorvência à 517 nm, calculou-se a % da atividade antioxidante de cada extrato. Os extratos acetônicos foram então quantificados, e o extrato de *P. swynnertonii* apresentou a maior atividade antioxidante (20,24 %), enquanto que o *P. spicatus* obteve o menor resultado (10,57 %), como é possível observar no **Gráfico 2**.

Contudo, tendo em conta a atividade oxidante da quercetina (99,47 %), que foi usada como controlo positivo, é visível que todos os extratos possuem baixa atividade antioxidante. Em estudos já realizados, o teor de ácido rosmarínico e a atividade antioxidante, foram diretamente proporcionais. Sendo assim, podemos afirmar que as espécies em estudo, têm baixo teor de ácido rosmarínico na sua constituição, o que resultou em um baixo poder antioxidante (Rijo et al., 2014a).

Gráfico 2: Resultado da determinação da Atividade antioxidante (%) de cada extrato estudado e da Quercetina (controlo positivo).



3.3. Atividade antimicrobiana pelo Método de difusão em poços

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos, usou-se o método de difusão em poços e tendo em conta todos os extratos, nenhum mostrou atividade antibacteriana significativa, apresentando zonas de inibição idênticas às do controlo negativo DMSO (5 mm), como é possível observar na **Tabela 5**.

Ao longo dos anos, cada vez mais as bactérias têm se mostrado mais resistentes aos antibióticos, facto esse que tem preocupado bastante a saúde pública (Gaspar-Marques, Rijo, Simões, Duarte, & Rodriguez, 2006). Com isso, a descoberta de novos antibióticos tem sido o principal objetivo dos pesquisadores (Valgas, Souza, Smânia, & Jr, 2007).

O método de difusão em poços é um método qualitativo, usado para avaliar a atividade antimicrobiana de extratos microbianos ou plantas (Balouiri, Sadiki, & Ibensouda, 2016). Os testes em ágar são os mais usados, visto que estes têm a vantagem de serem mais simples e a interpretação dos resultados serem através da visualização dos halos (Almeida et al., 2014).

Tabela 5: Resultado da atividade antimicrobiana dos seis extratos acetónicos usados no ensaio, pelo método de difusão em poços

Pa – *Pseudomonas aeruginosa*; *Ec* – *Escherichia coli*; *Sa* – *Staphylococcus aureus*; *Ef* – *Enterococcus faecalis*;

Sc – *Saccharomyces cerevisiae*; *Ca* – *Candida albicans*.

	Gram -		Gram +		Leveduras	
	<i>Pa</i>	<i>Ec</i>	<i>Sa</i>	<i>Ef</i>	<i>Sc</i>	<i>Ca</i>
Controlo positivo	32	33	21	20	29	29
Controlo negativo	5	5	5	5	5	5
<i>P. spicatus</i>	5	5	5	5	5	5
<i>P. cylindraceus</i>	5	5	5	5	5	5
<i>P. swynnertonii</i>	5	5	5	5	5	5

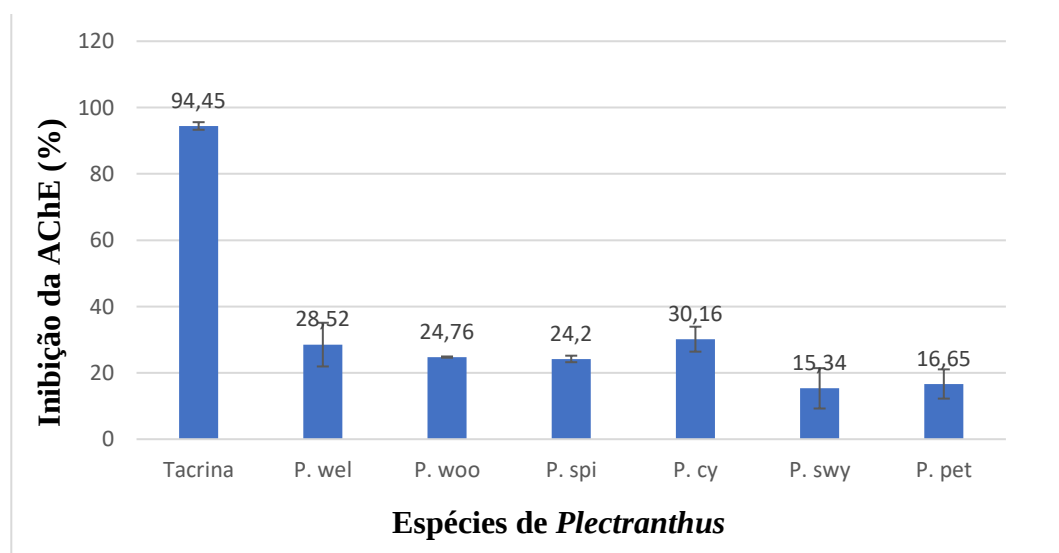
<i>P. petiolaris</i>	5	5	5	5	5	5
<i>P. welwitschii</i>	5	5	5	5	5	5
<i>P. woodii</i>	5	5	5	5	5	5

3.4. Atividade *in vitro* da inibição da acetilcolinesterase

A inibição da acetilcolinesterase foi avaliada pelo método de Ellman, usando um leitor de microplacas de 96 poços. A percentagem de inibição da AChE foi determinada em todos os extratos, a uma concentração de 1 mg/mL, e o *P. cylindraceus* foi o mais ativo, com uma inibição de $30,16 \pm 3,78\%$, como é possível observar no **Gráfico 3**.

A maior percentagem de inibição da acetilcolinesterase do extrato cetónico de *P. cylindraceus*, de acordo com Rijo et al. (2014a), pode estar associado à sua maior concentração de ácido rosmarínico na sua composição, sendo que no referido estudo, a inibição da AChE e o teor de ácido rosmarínico das espécies de *Plectranthus* estavam correlacionados.

Gráfico 3: Percentagem de inibição da acetilcolinesterase (AChE) das seis espécies de *Plectranthus* a uma concentração de 1 mg/mL



3.5. Ensaio de toxicidade geral com o modelo da *Artemia salina* L

Para avaliar a toxicidade de todos os extratos neste estudo, usou-se o modelo da *Artemia salina* L. Para analisar a capacidade tóxica do DMSO em relação as *Artemias*, foram realizados vários ensaios, em diversas concentrações de DMSO, como é possível observar na **Tabela 6**.

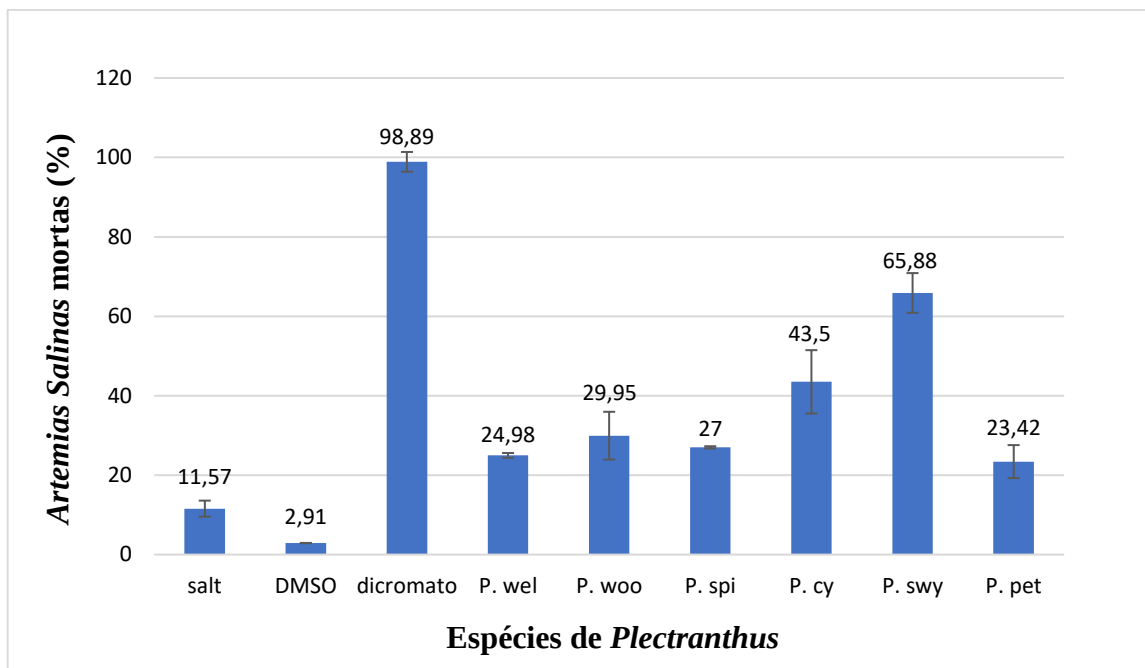
Tabela 6: Concentração de DMSO (mg/mL) e respetiva % de *Artemias Salinas* mortas.

<i>Concentração de DMSO (mg/mL)</i>	<i>% de Artemias mortas</i>
1	100
0,1	30,57
0,01	22,41
0,001	17,66
0,0001	13,27

Com os resultados obtidos na **Tabela 6** foi possível concluir que quanto maior for a concentração de DMSO, maior é o número de mortes das *Artemias salinas*. No entanto, mesmo sendo o DMSO um solvente tóxico para as *Artemias*, usou-se a mesma, à uma concentração de 0,1 mg/ml, que é onde observamos uma % intermédia de *Artemias* mortas.

Ao calcular a percentagem (%) de *Artemias* mortas por cada extrato, apenas dois extratos mostraram-se tóxicos para as *Artemias Salinas*, nomeadamente o *P. swynnertonii* e o *P. cylindraceus*, apresentando uma percentagem de letalidade acima dos 40 % como é possível observar no **Gráfico 4**. No entanto, o extrato mais tóxico foi o *P. swynnertonii* (CL= 65,88%), sendo que quando maior for o valor de CL, maior é a toxicidade.

Gráfico 4: % de *Artemia Salina* morta correspondente ao seu respectivo extrato – ensaio de toxicidade geral.



Os dois extratos considerados ativos foram novamente testados às concentrações de 0,1, 0,5 e 1 ppm e os números de náuplios mortos foram registados e usados para calcular a CL_{50} , que representa a concentração mínima capaz de matar 50% dos organismos vivos considerados (Gráficos 5 e 6).

Gráfico 5: Determinação da CL_{50} do *P. swynnertonii*

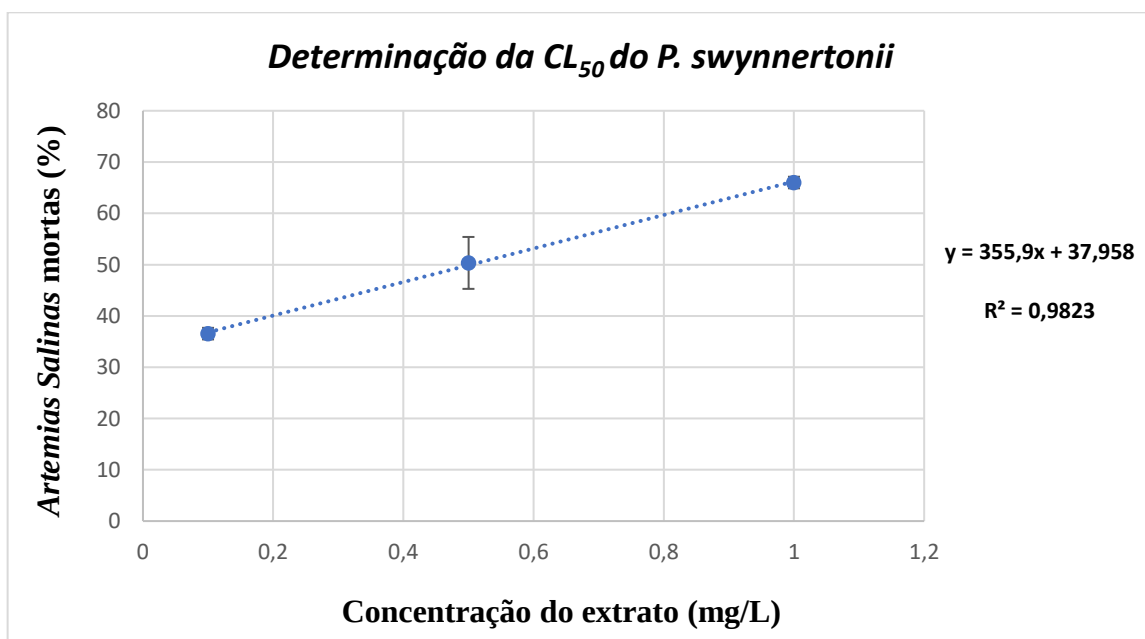
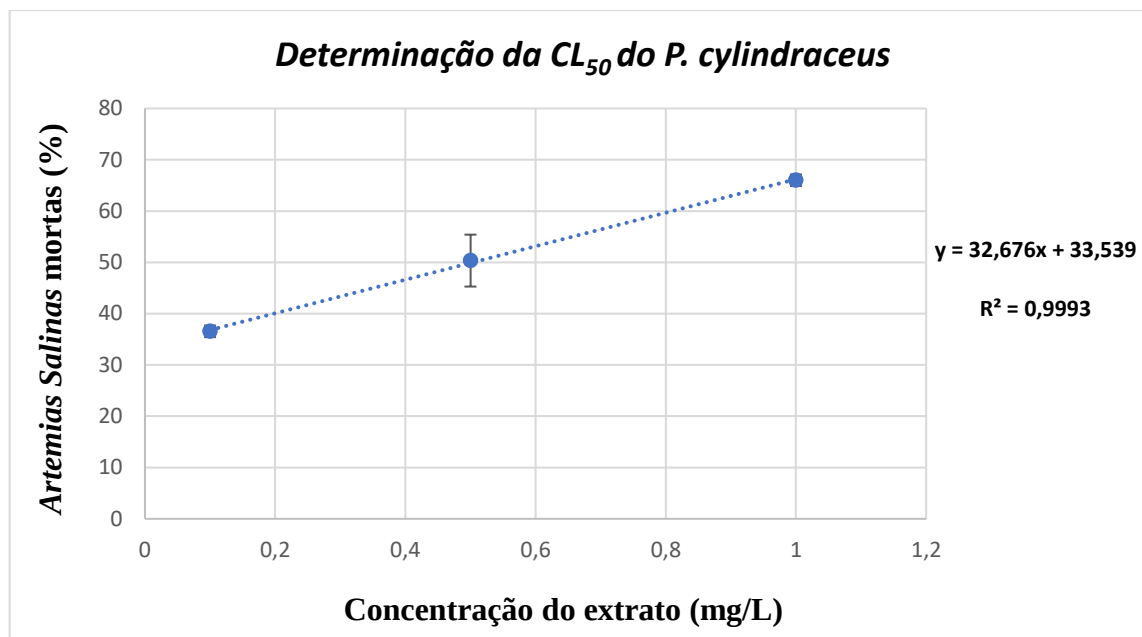


Gráfico 6: Determinação da CL₅₀ do *P. cylindraceus*

Tendo obtido as equações da reta dos dois extratos mais tóxicos, *P. cylindraceus* e *P. swynnertonii*, a fim de calcular as suas CL₅₀, o Y foi substituído por 50 e o valor de X correspondente a CL₅₀ de cada um dos extratos.

Os valores de CL₅₀ inferiores ou iguais a 1 mg/L foram considerados ativos e o extrato de *P. swynnertonii* foi o mais tóxico, como já era previsto, com a CL₅₀ de 0,036 mg/L, assim apresentado na **Tabela 7**.

Tabela 7: Valores de CL₅₀ (mg/L) para os extratos mais ativos, usando o modelo de *Artemia Salina*.

	CL ₅₀ (mg/L)
<i>P. cylindraceus</i>	0,504
<i>P. swynnertonii</i>	0,036

4. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

O género *Plectranthus* L' Her. pertence à família Lamiaceae, assim como outros géneros de plantas comercialmente importantes, nomeadamente, *Salvia*, *Ocimum* ou *Mentha*, encontram-se geograficamente distribuídas pelo pacífico, pela Índia, Austrália, Madagáscar e África. Por ter inúmeras vantagens culturais, como tolerância a uma atmosfera seca, baixa exigência de luz e facilidade de adaptação a condições semi-secas, além de serem atraentes, robustos e fáceis de crescer, é uma espécie que tem se destacado bastante.

Além dos seus usos etnobotânicos, os *Plectranthus* são notórios na horticultura, como nos jardins, rochedos e bonsai, na floricultura ao produzirem flores muito atraentes e resistentes a pragas e no uso doméstico, sendo usado na culinária, como repelente de moscas e aromático. Este género abrange um número diversificado de espécies, mas muitas delas ainda não foram estudadas quanto à sua composição química e / ou bioatividade.

Ao longo deste estudo, seis espécies de *Plectranthus* (*P. swynnertonii*, *P. welwitschii*, *P. woodii*, *P. cylindraceus*, *P. spicatus* e *P. petiolaris*) foram estudadas a fim de avaliar as suas atividades biológicas, nomeadamente, a inibição da acetilcolinesterase, atividades antimicrobiana e antioxidante, e toxicidade geral em *Artemia Salina*.

Para tal, os seis extratos acetónicos de *Plectranthus* foram preparados usando um método de extração assistido por ultrassons. O extrato acetónico *P. petiolaris* exibiu maior rendimento de extração (11,07 % (m/m)), fato esse que, de acordo com Rijo et al. 2014, deve-se a maior ruptura celular do seu material vegetal em relação aos outros extratos em estudo, o que possibilitou uma lixiviação dos componentes no solvente extrator, permitindo um maior rendimento de compostos extraídos.

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de DPPH, sendo realizado inicialmente o método qualitativo, onde todos demonstraram ter algum poder antioxidante. Devido a este resultado, foi realizado então o ensaio quantitativo, na qual o *P. swynnertonii* apresentou maior atividade antioxidante (20,24 %). Em comparação com o controlo positivo usado, a quercetina (99,47 %), os extratos acetónicos estudados mostraram baixa atividade antioxidante.

Tem havido um interesse crescente para encontrar antioxidantes naturais nas plantas, incluindo produtos químicos voláteis, devido à inibição do dano oxidativo.

O aumento da resistência a antibióticos a nível mundial ao longo dos anos, é bastante preocupante, fazendo com que a busca por novos antibióticos a base de plantas seja o maior desafio e o principal objetivo dos pesquisadores. Relativamente a atividade antimicrobiana,

pelo método de difusão em poços, nenhum dos extratos demonstrou resultados positivos contra as bactérias Gram-positivas e negativas e leveduras testadas, apresentando halos de inibição de 5 mm, idênticas ao do controlo negativo.

Na atividade *in vitro* da inibição da AChE, o extrato acetónico *P. cylindraceus* demonstrou ser o mais ativo com uma inibição de $30,16 \pm 3,78\%$. Portanto, a busca por novos inibidores da AChE, particularmente a partir de produtos naturais, com maior eficácia, deve ser um assunto importante a pesquisar.

O ensaio da toxicidade geral usando o modelo da *Artemia salina* L, foi utilizado para pesquisar a toxicidade de todos os extratos preparados neste estudo. Somente os extratos *P. swynnertonii* e *P. cylindraceus* foram considerados tóxicos para *Artemia salina* com letalidade acima dos 40 % e após determinação da CL₅₀ dos mesmos, o *P. swynnertonii* foi o mais tóxico com a CL₅₀ de 0,036 mg/L.

Outros estudos de bioatividade devem ser realizados a fim de descobrir outras potenciais bioatividades e quais os compostos bioativos responsáveis pelas atividades reveladas. Este rastreio preliminar dos extratos de *Plectranthus* é importante para selecionar quais as plantas que devem ser investigadas para estudos fitoquímicos adicionais.

O objetivo destas pesquisas é que no futuro possamos ter fármacos a base de plantas cada vez mais inovadores e que estes tenham menos efeitos colaterais que os medicamentos já existentes no mercado

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, E., Bona, M. De, Gisele, F., Fruet, T. K., Cristina, T., Jorge, M., & Moura, A. C. De. (2014). Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos, (cim), 218–225.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review \$. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2005). Plants as a source of anti-cancer agents, 100, 72–79.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2011). Minireview, 4, 687–699.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery, 303–336.
- Duarte-almeida, J. M., José, R., Genovese, M. I., & Lajolo, F. M. (2006). AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE UTILIZANDO SISTEMA β -CAROTENO / ÁCIDO LINOLÉICO E MÉTODO DE SEQÜESTRO DE RADICAIS DPPH • 1, 26(2), 446–452.
- Garcia, C., Teodósio, C., Oliveira, C., Oliveira, C., Díaz-lanza, A., & Reis, C. (2018). Naturally Occurring Plectranthus -derived Diterpenes with Antitumoral Activities, 1–30.
- Gaspar-Marques, C., Rijo, P., Simões, M. F., Duarte, M. A., & Rodriguez, B. (2006). Abietanes from Plectranthus grandidentatus and P . hereroensis against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria, 13, 267–271.
- Hasan, S. M. R., Hossain, M., Akter, R., Jamila, M., Mazumder, E. H., & Rahman, S. (2009). DPPH free radical scavenging activity of some Bangladeshi medicinal plants, 3(11), 875–879.
- Islam, M. T. (2017). Diterpenes and Their Derivatives as Potential Anticancer Agents, (February).

- Lukhoba, C. W., Simmonds, M. S. J., & Paton, A. J. (2006). *Plectranthus* : A review of ethnobotanical uses, 103, 1–24.
- Mbaveng, A. T., Kuete, V., & Efferth, T. (2017). Potential of Central , Eastern and Western Africa Medicinal Plants for Cancer Therapy : Spotlight on Resistant Cells and Molecular Targets, 8(June).
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. A., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., & Mclaughlin, J. L. (1982). Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents, 45, 31–34.
- Muniyandi, K., George, E., Mudili, V., Kumar, N., Anthuvan, A. J., Krishna, K., Natarajan, G. (2017). Antioxidant and anticancer activities of *Plectranthus stocksii* Hook. f. leaf and stem extracts. *Agriculture and Natural Resources*.
- Murthy, P. S., Ramalakshmi, K., & Srinivas, P. (2009). Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chemistry*, 114(3), 1014–1018.
- Ntungwe N. Epole, Marçalo Joana, Garcia Catarina, Reis Catarina, Teodósio Catarina, Oliveira Carolina, Oliveira Cláudia, Roberto Amílcar, R. P. (2017). Biological activity screening of seven *Plectranthus* species *Pesquisa de atividade biológica de sete espécies de Plectranthus*.
- Oliveira, G. L. S. (2015). Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH •: estudo de revisão, (2009), 36–44.
- Pooley, E., 1998. A field guide to wild flowers of kwazulu-natal and the eastern region. Natal Flora Publications Trust, Durban.
- Rice, L. J., Brits, G. J., Potgieter, C. J., & Staden, J. Van. (2011). *Plectranthus* : A plant for the future ? *South African Journal of Botany*, 77(4), 947–959.
- Rijo, P., Batista, M., Matos, M., Rocha, H., Jesus, S., & Simões, M. F. (2012). Screening of antioxidant and antimicrobial activities on *Plectranthus* spp . extracts *Pesquisa das actividades antioxidante e antimicrobiana em extractos de plantas do género Plectranthus*.

- Rijo, P., Faustino, C., & Simões, M. F. (2013). Antimicrobial natural products from *Plectranthus* plants, 922–931.
- Rijo, P., Falé, P. L., Serralheiro, M. L., Simões, M. F., Gomes, A., & Reis, C. (2014a). Optimization of medicinal plant extraction methods and their encapsulation through extrusion technology. *MEASUREMENT*.
- Rijo, P., Matias, D., Fernandes, A. S., Simões, M. F., & Nicolai, M. (2014). Antimicrobial Plant Extracts Encapsulated into Polymeric Beads for Potential Application on the Skin, 479–490.
- Smanski, M. J., Peterson, R. M., & Shen, B. (2012). *Platensimycin and Platencin Biosynthesis in Streptomyces platensis*, Showcasing Discovery and Characterization of Novel Bacterial Diterpene Synthases. *Natural product biosynthesis by microorganisms and plants Part A* (1st ed., Vol. 515). Elsevier Inc.
- Valgas, C., Souza, S. M. De, Smânia, E. F. A., & Jr, A. S. (2007). SCREENING METHODS TO DETERMINE ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NATURAL PRODUCTS, 369–380.
- Van Jaarsveld, E. (2006). Southern African *Plectranthus* 11th edition. Fernwood Press.
- Van Jaarsveld, E. (1987). The *Plectranthus* Handbook. National Botanical Institute, Cape Town.

6. ANEXOS

6.1. Anexo I - Naturally Occurring Plectranthus-derived Diterpenes with Antitumoral Activities



Rijo-CPD-MS (2).pdf

6.2. Anexo II - Biological activity screening of seven Plectranthus species



screening 7
species.pdf