

**HELENA OLIVEIRA DE MELO**

**PREPARAÇÃO DE EXTRATOS DO GÉNERO  
*PLECTRANTHUS* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
BIOLÓGICA**

Orientadora científica: Professora Doutora Patrícia Rijo

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

**Lisboa  
2020**

**HELENA OLIVEIRA DE MELO**

**Preparação de extratos do género *Plectranthus* e  
avaliação da atividade biológica**

Dissertação defendida em provas públicas na Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 18 de fevereiro de 2020, perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação nº 33/2020, de 30 de janeiro de 2020, com a seguinte composição:

Presidente: Professor Doutor Luís Monteiro Rodrigues

Arguente: Professora Doutora Célia Faustino

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Rijo

**Lisboa**

**2020**

***“It’s always darkest before the dawn.”***

Thomas Fuller

## **Dedicatória**

À minha família, por estarem sempre lá, para tudo! Não podia ter pedido melhor.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à professora Patrícia Rijo, por me ter convidado e incentivado a fazer parte da sua equipa de investigação, dando-me a conhecer toda uma outra vertente da área científica e por aceitar ser minha orientadora na área que me despertou mais interesse, a Fitoquímica. Agradeço-lhe por ter sido sempre tão prestável, compreensível e competente e, acima de tudo, por ter visto potencial em mim para enveredar neste projeto.

Um agradecimento especial à minha Madrinha de Faculdade, a Leonor Fonseca, por todo o apoio que me deu nestes cinco anos, por ter estado sempre ao meu lado quando precisei, por me ter guiado nos estudos e na vida universitária. Sem ela, não estaria aqui hoje a apresentar a minha dissertação.

Gostaria também de agradecer à minha amiga e colega Márcia Filipe, por ter sido a minha colega de casa, a minha colega de laboratório, a minha colega de estudo e minha amiga; por me ter dado apoio e passado comigo as várias situações difíceis durante estes cinco anos.

Para o fim deixo o maior agradecimento à minha família, ao meu namorado João Dias, por me ter apoiado e acreditando em mim. Devo-lhe muito. Obrigado por sempre me teres encorajado a fazer mais e melhor e por me tranquilizares e ouvires nas partes melhores e piores desta jornada. Agradeço aos meus pais e à minha tia Lúcia, por me terem permitido tirar o meu curso de sonho e por me terem proporcionado um melhor ensino e um enorme apoio. Não tenho como agradecer o que fizeram por mim e pelo apoio e incentivo que me deram, fazendo-me sentir perto, mesmo estando longe. Gostava de agradecer também à minha avó e às minhas madrinhas Marta e Rosa, por também me darem sempre todo o apoio que precisei e nunca me deixarem desistir. Para último deixo a minha Ahri, que me fez sentir em casa durante estes cinco anos, nunca me deixando sozinha e estando sempre presente nos altos e baixos deste percurso. Obrigada a todos por nunca deixarem de acreditar em mim.

## Resumo

As plantas medicinais e os seus princípios ativos são muito importantes para a obtenção de novos compostos. Neste trabalho foram estudados dois extratos das plantas *Plectranthus xerophilus* Codd. e *P. madagascariensis* (Pers.) Benth (família *Lamiaceae*). A atividade antimicrobiana dos extratos preparados foi avaliada, pelo método de microdiluição contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O extrato acetónico de *P. xerophilus* foi preparado pelo método de extração por ultrassons (10% m/v) que demonstrou atividade antimicrobiana (valor de Concentração Mínima Inibitória - CMI de 62,5 µg/mL), contra a bactéria *S. aureus*. Os óleos essenciais de *P. madagascariensis*, obtidos por hidrodestilação (método de Clevenger), demonstraram atividade antimicrobiana contra a bactéria *E. faecalis* (valor de CMI de 15,63 µg/mL). Os restantes ensaios não demonstraram atividade relevante em comparação com os controlos positivos, nas bactérias testadas. Dado que o extrato de *P. madagascariensis* demonstrou possuir uma elevada atividade antimicrobiana, procedeu-se ao isolamento do composto maioritário, 6,7-dehidrooileanona (DHR), obtendo-se um rendimento de 47,28 % (m/m; massa composto/massa extrato).

A atividade antimicrobiana demonstrada pelo composto DHR deve ser elucidada, nomeadamente quanto ao seu mecanismo de ação, para o desenvolvimento de novos fármacos, comprovando-se, assim, a aposta nas plantas medicinais.

## ***Abstract***

Medicinal plants and their active principles are very important in obtaining new compounds. In this work two extracts of *Plectranthus xerophilus* Codd and *P. madagascariensis* (Pers.) Benth (*Lamiaceae* family) plants were studied. The antimicrobial activity of the prepared extracts was evaluated through the microdilution method against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* bacteria.

The acetonic *P. xerophilus* extract was prepared by the ultrasound extraction method (10% w/v) which demonstrated antimicrobial activity (Minimum Inhibitory Concentration value - MIC 62,5 µg/mL) against the *S. aureus* bacteria. *P. madagascariensis* essential oils obtained by hydro distillation (Clevenger method), demonstrated antimicrobial activity against *E. faecalis* bacteria (MIC value of 15,63 µg/mL). The remaining assays showed no relevant activity compared to positive controls in the tested bacteria. Since *P. madagascariensis* extract was shown to have high antimicrobial activity, the major compound was isolated, 6,7-dehydroroyleanone (DHR), yielding 47,28% (w/w; compound mass/mass extract).

The antimicrobial activity demonstrated by the DHR compound should be elucidated, in particular as to its action mechanism, for the development of new drugs, thus proving the bet on medicinal plants.

# Índice

Agradecimentos .....	V
Resumo .....	VI
<i>Abstract</i> .....	VII
Índice .....	VIII
Lista de figuras .....	X
Lista de tabelas .....	XI
Lista de gráficos.....	XII
Abreviaturas, siglas e símbolos .....	XIII
Capítulo 1. Introdução.....	<i>I</i>
1.1    Cancro .....	2
1.2    Plantas medicinais e usos terapêuticos .....	2
1.3    Uso de plantas medicinais em África .....	4
1.4    Género <i>Plectranthus</i> .....	5
1.5    Diterpenos com esqueleto de Abietanos.....	6
1.6    Roileanonas .....	6
1.7    6,7-dehidroroileanona .....	7
1.8    Diterpenos presentes no género <i>Plectranthus</i> e atividade microbiana....	8
Capítulo 2. Parte experimental.....	<i>10</i>
2.1    Material e Métodos.....	11
2.1.1    Material vegetal .....	11
2.1.2    Metodologia de extração do material vegetal <i>P. xerophilus</i> .....	11
2.1.3    Microrganismos.....	11
2.2    Atividade Antioxidante .....	12
2.2.1    Reagentes e solventes .....	12
2.2.2    Ensaio de atividade antioxidante .....	12
2.3    Atividade Antimicrobiana .....	12



2.3.1	Método da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	12
2.3.2	Método da determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	12
2.4	Metodologia de extração do óleo da <i>P. madagascariensis</i>	13
2.5	Metodologia de isolamento da 6,7-dehidrooleanona	13
2.6	Ensaio da Toxicidade Geral em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
<b>Capítulo 3. Resultados e Discussão</b>		<b>15</b>
3.1	Extrato de <i>P. xerophilus</i>	16
3.2	Ensaio da Atividade Antioxidante da <i>P. xerophilus</i>	16
3.3	Ensaio da Atividade Antimicrobiana da <i>P. xerophilus</i>	17
3.3.1	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	17
3.4	Extrato da <i>P. madagascariensis</i>	18
3.5	Ensaio da Atividade Antimicrobiana da <i>P. madagascariensis</i>	19
3.5.1	Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)	19
3.6	Isolamento da 6,7-dehidrooleanona	20
3.6.1	Recristalização	20
<b>Capítulo 4. Conclusão</b>		<b>22</b>
<b>Capítulo 5. Bibliografia</b>		<b>24</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1</b> - Compostos derivados de plantas com atividade anticancerígena .....	4
<b>Figura 2</b> - Estrutura dos Abietanos .....	6
<b>Figura 3</b> - Estrutura das Royleanonas .....	6
<b>Figura 4</b> - Estrutura da 6,7-dehidroroileanona (DHR) .....	7

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1</b> - Peso e rendimento do extrato da <i>P. xerophilus</i> .....	15
<b>Tabela 2</b> - Peso e rendimento do óleo essencial extraído da <i>P. madagascariensis</i> .....	17
<b>Tabela 3</b> - Peso da junção das frações obtidas da coluna de fracionamento .....	19
<b>Tabela 4</b> - Massa da junção das frações 11-18 contendo 6,7-dehidoroileanona .....	19
<b>Tabela 5</b> - Peso e rendimento da 6,7-dehidoroileanona recristalizada .....	20

## Lista de gráficos

- Gráfico 1** - Atividade antioxidante do extrato da *P. xerophilus* à concentração de 10 µg/mL ..16
- Gráfico 2** - Valores da concentração mínima inibitória do extrato de *P. xerophilus* .....17
- Gráfico 3** - Resultados da Atividade Antimicrobiana da *P. xerophilus* .....18

## Abreviaturas, siglas e símbolos

**DHR**

*P. xerophilus*

*P. madagascariensis*

**CMI**

**CBM**

**YPD**

**UCF**

*S. aureus*

*E. faecalis*

**IC<sub>50</sub>**

*6,7-dehidrooleanona*

*Plectranthus xerophilus codd*

*Plectranthus madagascariensis (Pers.) Benth*

Concentração Mínima Inibitória

Concentração Bactericida Mínima

Estrato de levedura 1%, peptona 0,5% e dextrose

Unidade de colónias formadas

*Staphylococcus aureus*

Enterococcus faecalis

50% da concentração máxima inibitória

## **Capítulo 1. Introdução**

## 1.1 Cancro

O Cancro é a doença com maior mortalidade e morbilidade em todo o mundo, a seguir às doenças cardiovasculares. Estima-se, segundo o site da Organização Mundial de Saúde, que, em 2018, 9.6 milhões de pessoas tenham morrido devido ao cancro. Deste modo o cancro tem vindo a torna-se numa das principais prioridades na área da saúde em muitos países.<sup>1</sup>

A palavra cancro designa um grupo de patologias caracterizadas pelo crescimento anormal de células, fora dos seus limites usuais, sendo que estas podem invadir partes adjacentes do corpo e ou espalhar-se para outros órgãos.<sup>12</sup> O cancro pode afetar praticamente todas as partes do corpo humano, possuindo diversificações moleculares e anatómicas que requerem estratégias de ataque específicas.<sup>1</sup> Os fármacos utilizados na quimioterapia, como os citotóxicos, são eficazes biologicamente, contudo, estes possuem imensos efeitos adversos tóxicos para o paciente.<sup>3</sup> Assim, novos estudos têm sido desenvolvidos para a realização de terapêuticas mais seletivas das células cancerosas, diminuindo os efeitos secundários ao não causarem toxicidade às células não tumorais.<sup>4</sup>

## 1.2 Plantas medicinais e usos terapêuticos

A natureza é uma fonte atrativa de novos compostos terapêuticos.<sup>7</sup> Assim, o isolamento de novos produtos naturais pode fornecer novas moléculas com potencial atividade biológica, podendo desencadear o desenvolvimento de novos fármacos, como relatado no passado.

As plantas fazem parte da medicina há milhares de anos, integrando os tratamentos tradicionais em muitos países. Hoje, mais que nunca, os médicos, um pouco por todo o mundo, complementam a medicina convencional com a tradicional, havendo um aumento do uso de plantas medicinais nos países desenvolvidos.<sup>8</sup>

O número de casos de cancro no mundo tem vindo a aumentar drasticamente, levando a um aumento da investigação de compostos que sejam tóxicos para as células cancerígenas, mas não para as restantes células do nosso organismo. Os fármacos antitumorais usados anteriormente possuíam elevada toxicidade, não apenas nas células tumorais, mas também nas restantes células saudáveis do organismo próximas da zona onde se desenvolveu o cancro.<sup>9</sup>

Hoje em dia, 80% dos fármacos antitumorais existentes são produtos de origem natural ou derivados.<sup>10</sup> Contudo, existem muitos compostos derivados de plantas, com aprovação para a sua utilização em quimioterapia, que também apresentam efeitos tóxicos e indesejados para o organismo. Isto contribuiu para uma maior procura de novos agentes antitumorais, na qual as plantas desempenham um papel muito importante.<sup>11</sup>

As plantas produzem uma variedade de metabolitos secundários, que contribuem como defesa a fatores exteriores, são exemplos os alcaloides, os flavonoides, os isoflavonoides, os taninos e os terpenos.<sup>11</sup>

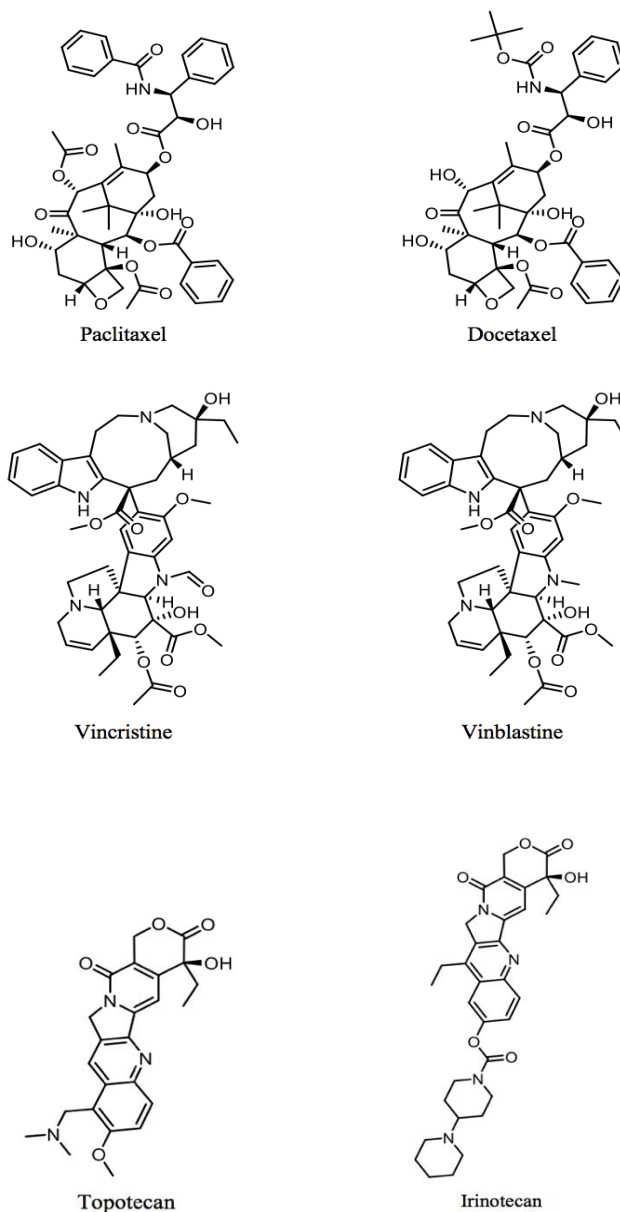
São exemplos de alguns fármacos derivados de plantas o Paclitaxel, o Docetaxel, o Irinotecano, o Topotecano e os Alcaloides de Vinca (representados nas **Figuras 1 e 2**).<sup>7, 12</sup>

Os Alcaloides de Vinca foram dos primeiros compostos de plantas a serem isolados, sendo eles a Vincristina e a Vinblastina; foram introduzidos em 1963 e 1965, respetivamente. São isolados da *Catharanthus roseus*. Estes inibem a polimerização dos microtúbulos existentes nas células tumorais e induzem a despolimerização dos túbulos formados, sendo utilizados, especialmente, em casos de Leucemia. A Vinblastina possui atividade imunossupressora.<sup>13</sup>

O Paclitaxel, um dos outros compostos antitumorais existentes, foi introduzido no mercado em 1993, sendo este obtido por isolamento, da árvore *Taxus brevifolia*. Mais tarde, em 1995, surgiu um análogo semi-sintético do Paclitaxel, o Docetaxel, obtido através das folhas da *Taxus baccata*. Estes diterpenoides são extremamente importantes a nível medicinal e possuem mecanismos de ação muito semelhantes. Ambos são capazes de estabilizar os microtúbulos presentes nas células, levando a uma interrupção da meiose na fase M do ciclo celular, sendo também imunossupressores.<sup>7, 13-17</sup>

O Irinotecano e o Topotecano, compostos derivados da Camptotecina, foram inicialmente obtidos através da madeira e da casca da *Camptotheca accuminata*. O seu mecanismo de ação surge através da inibição da Topoisomerase I.<sup>7</sup> O Topotecano, ao contrário do Irinotecano, não é um pró-fármaco e encontra-se na forma de carboxilato inativo a pH neutro. Estas características conferem ao Topotecano uma atividade antitumoral e toxicidade diferentes do Irinotecano.<sup>18</sup>





**Figura 1.** Compostos derivados de plantas com atividade anticancerígena.

### 1.3 Uso de plantas medicinais em África

Ao longo da última década a utilização de plantas medicinais tem tido um grande impacto na medicina. Estas continuam a ter um papel principal no sistema de saúde de muitas populações pelo mundo, especialmente em países em desenvolvimento, onde este tipo de medicina tradicional faz parte das suas vidas desde o início dos tempos. Deste modo, o reconhecimento e o desenvolvimento económico e medicinal destas plantas têm vindo a ocorrer, não só nos países em desenvolvimento, como também nos países industrializados.<sup>5</sup>

Devido ao aumento dos problemas de saúde em alguns países subdesenvolvidos e ao aumento do aparecimento dos casos de cancro nestas regiões, as populações têm vindo a

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

procurar, cada vez mais, medicinas alternativas, através de curandeiros e da utilização de plantas medicinais, uma vez que não possuem os recursos para recorrer à medicina ocidental.<sup>6</sup> Além disso, os tratamentos através de plantas medicinais são mais bem aceites nestes países, devido à sua cultura e à sua visão espiritual.<sup>5</sup> O uso de plantas na formulação de “remédios” é muito característico na África do Sul, sendo algo que se duvida mudar com os anos. Estima-se que 27 milhões de Sul Africanos utilizam “remédios” medicinais, feitos a partir de mais de 1 020 plantas e 150 espécies de animais.<sup>5</sup>

#### 1.4 Género *Plectranthus*

O género *Plectranthus* é constituído por cerca de 300 espécies diferentes e pertence à família *Lamiaceae*. Encontra-se, principalmente, no este e sul de África, na Ásia, na Austrália e em algumas ilhas do Pacífico.<sup>9, 10</sup>

O género *Plectranthus* possui um elevado interesse a nível de investigação, uma vez que as plantas *Plectranthus* spp. são extremamente utilizadas na medicina tradicional, nos seus países de origem. Estas são utilizadas como antissépticos, vermicidas, no tratamento de infeções, em dores de dentes, dores de barriga e alergias, entre outros.

As plantas deste género tendem a ser aromáticas, devido à sua produção de óleos essenciais. Para além disso, muitas das suas espécies *Plectranthus* produzem diterpenos, sobretudo abietanos característicos pela sua cor viva (normalmente amarela, laranja ou avermelhada).<sup>21</sup>

Segundo estudos fitoquímicos o género *Plectranthus* também é uma fonte natural de quinonas diterpénicas, coleones e outras roileanonas, as quais possuem diversas atividades biológicas. Os grupos funcionais mais promissores são o fenol e as quinolonas diterpénicas, presentes em algumas roileanonas, como no caso da 6,7-dehidroroileanona (DHR).<sup>22</sup>

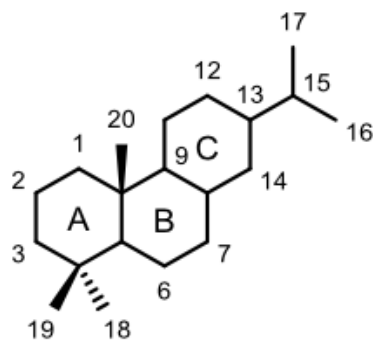
A *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth é uma erva aromática perene, por sua vez nativa da África do Sul, sendo extremamente utilizada na medicina tradicional, tanto em doenças respiratórias, como a nível cutâneo. As folhas esmagadas são utilizadas no tratamento da Sarna (*Sarcoptes scabiei*) e em feridas pequenas. A infusão da planta é utilizada para curar gripes, tosse e asma.<sup>10, 11</sup> O componente principal presente no óleo essencial da planta é a 6,7-dehidroroileanona (DHR).<sup>23</sup> O extrato da *Plectranthus madagascariensis* demonstrou efeito *antifeedant* em bactérias e insetos, bem como capacidade antioxidante.<sup>24</sup>

A *Plectranthus xerophilus* codd é uma planta pouco estudada, sendo que não se encontra muita informação a seu respeito. Existe, essencialmente, na África do Sul, sendo utilizada, maioritariamente, a nível ornamental.

## 1.5 Diterpenos com esqueleto de Abietanos

Os diterpenos constituem a segunda maior classe de terpenos. Estruturalmente, estes são formados por quatro isoprenos (estes possuindo 20 átomos de carbono) e também por grupos metilo.<sup>11</sup> Os diterpenos são os compostos mais comuns e abundantemente presentes na família *Lamiaceae*, algo que também se aplica ao género *Plectranthus*. Assim, a maioria dos estudos realizados em espécies *Plectranthus* focam-se no isolamento de um grande espectro de diterpenoides, como relata *Lukhoba et al.*<sup>25, 26</sup> A junção destes diterpenos a classes secundárias de metabolitos tem sido utilizada em estudos quimiotaxonómicos, como marcadores.<sup>26</sup>

Os diterpenos abietanos (estrutura tricíclica) são os derivados com maior presença na maioria da família *Lamiaceae*. Os diterpenos abietanos, bem como os seus derivados, demonstram uma largo espectro de atividade biológica, possuindo atividade anti-viral, antimicrobial e anti-inflamatória, contendo efeito gastroprotetivo e, especialmente, atividade antiproliferativa em linhas celulares de tumores em humanos.<sup>12, 27</sup> Devido às propriedades apresentadas, estes demonstram grande potencial farmacológico e medicinal, ao nível de desenvolvimento de novos fármacos.<sup>28</sup>

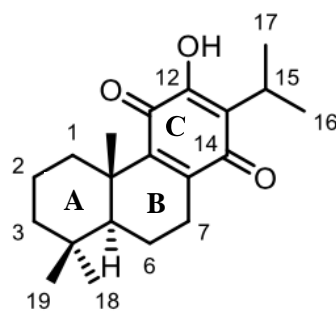


**Figura 2.** Estrutura e numeração dos Abietanos.

## 1.6 Roileanonas

As roileanonas são uma classe de compostos de diterpenos tricíclicos com esqueleto de abietano. Estas são constituídas por um anel quinóide C, normalmente em junção com um anel oxidado B e, por vezes, possuem também um anel oxidado A. Os grupos funcionais hidroxilo e carbonilo ligam-se, por norma, ao C<sub>6</sub>, C<sub>7</sub> e C<sub>11</sub> (**Figura 3**).<sup>28</sup>

As roileanonas constituem o grupo cromóforo 12-hydroxy-11,14-*p*-benzoquinona do anel C da estrutura dos diterpenos com esqueleto de abietano.<sup>28</sup>



**Figura 3.** Estrutura e numeração das roileanonas.

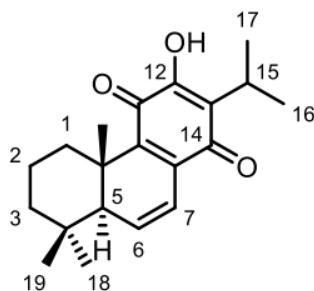
## 1.7 6,7-dehidroroileanona

A 6,7-dehidroroileanona (DHR, **Figura 4**) trata-se de uma roileanona que pode ser encontrada em várias plantas do género *Plectranthus*, inclusive na *P. madagascariensis* (Pers.) Benth. Este composto encontra-se no óleo essencial da planta, sendo este obtido por hidrodestilação de partes secas da planta (principalmente folhas), através do *Clevenger apparatus*. Posteriormente, já foram realizados estudos ao óleo, identificando os seus principais compostos, sendo que a DHR foi o composto encontrado em maior percentagem, como podemos comprovar em *Ascensão et al* e em *Garcia et al.*<sup>11, 22, 29</sup>

A DHR demonstra ser um composto muito promissor, uma vez que já demonstrou atividade citotóxica em outros diversos estudos, como passo a descrever. Este composto foi testado em células tumorais do melanoma humano, do sistema nervoso, do colon e inclusive em células de leucemia humana, sendo que todos os estudos apresentaram resultados positivos da DHR contra estes tumores. No artigo *Gazim et al.* foi testada a DHR contra três tipos de células tumorais, as células do melanoma humano, do sistema nervoso e do colon. Estas apresentaram uma percentagem de inibição de crescimento de 3,34%, 15,30% e de 12,08%, respetivamente. Neste mesmo estudo também foi comprovada a elevada atividade antioxidante por parte da DHR.<sup>30</sup>

No artigo *Kusumoto et al.* o nosso composto de interesse foi testado contra células de leucemia humana, demonstrando, mais uma vez, uma elevada atividade citotóxica específica, obtendo um  $IC_{50}$  de 4,46  $\mu M$ .<sup>31</sup> Existe ainda um estudo realizado em células do cancro da próstata que demonstrou uma excelente atividade antiproliferativa da DHR contra estas células tumorais, assim como uma ligeira atividade citotóxica contra células do cancro cervical, obtendo  $IC_{50}$  de 6,56  $\mu M$  e de 9,42  $\mu M$ , respetivamente, como podemos comprovar no artigo *Choudhary et al.*<sup>32</sup>

Assim, através dos estudos acima mencionados, é possível comprovar que a DHR possui atividade citotóxica contra diversos tipos de cancro, tornando-se um composto de interesse para estudos futuros.



**Figura 4.** Estrutura da 6,7-dehidrooleanona (DHR).

## 1.8 Diterpenos presentes no género *Plectranthus* e atividade microbiana

As doenças infecciosas são uma das preocupações que têm vindo a crescer nos últimos anos. Estas representam uma das principais causas de morte nos países em desenvolvimento, especialmente a morte por microrganismos resistentes adquiridos em ambiente hospitalar. O uso excessivo de antibióticos ao longo das últimas décadas enfatizaram esta capacidade intrínseca de resistência. Um dos principais microrganismos adquirido a nível hospitalar é o *Staphylococcus aureus*, patógeno humano e comensal. Estirpes deste microrganismo que criaram resistências às  $\beta$ -lactamases, as *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), têm vindo a ser debatidas há mais de 40 anos.

Como descrito acima, as plantas medicinais têm vindo a ser alvo de vários estudos farmacológicos em diversas áreas, inclusive a cerca da sua atividade antimicrobiana. Os diterpenos apresentam ser compostos antimicrobianos promissores, devido à sua grande variabilidade estrutural e a uma gama diversificada de padrões oxidados. A análise da atividade antimicrobiana de diterpenos semelhantes pode vir a oferecer mais informações sobre os requisitos estruturais para a bioatividade desses compostos, contribuindo assim para a síntese de novas moléculas antimicrobiais. A produção destes compostos por algumas espécies *Plectranthus* levou a uma maior investigação a nível fitoquímico destas plantas. *Gibbons S. et al.* investigou a química e a atividade antibacterial do extrato da *P. ernstii* isolando três diterpenos antimicrobiais. Sendo que um deles inclusive exibiu atividade antibacterial moderada contra um espectro de MRSA. Apesar do mecanismo de ação dos diterpenos em células procariontas ainda ser desconhecido, chegaram à conclusão de que os vinte carbonos em formação bicíclica ou tricíclica é necessária para garantir uma interação hidrofóbica com os alvos microbiais, que continuam desconhecidos. Algumas experiências beneficiaram do aumento das propriedades lipofílicas a fim de haver um aumento da atividade antimicrobiana.<sup>33</sup>

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi usada neste estudo e também está associada à toxicidade geral de compostos e extratos. Estes organismos eucariotas unicelulares são não

patogénicos e possuem semelhanças significativas, tanto a nível genético como a nível proteico, com os mamíferos, sendo, por isso, muito utilizadas em estudos de toxicidade geral.

A *S. cerevisiae* possui mecanismos de ativação metabólica próprios (citocromo P450) e de destoxificação, que não estão presentes em bactérias.<sup>34</sup> Como se trata de uma levedura, tem a vantagem de crescer rapidamente em culturas líquidas, simplificando os ensaios e tornando-os rápidos, rentáveis e requerendo pequenos volumes.<sup>35</sup> Trata-se de um ensaio muito utilizado no estudo preliminar da toxicidade, como podemos comprovar em vários trabalhos como *Roque et al. 2017, Silva et al. 2016.*<sup>35, 36</sup>

## **Capítulo 2. Parte experimental**

## 2.1 Material e Métodos

### 2.1.1 Material vegetal

*P. xerophilus* Codd e *P. madagascariensis* (Pers.) Benth foram cultivadas no Parque Botânico da Tapada da Ajuda (Instituto Superior Agrário, Lisboa, Portugal), a partir de estacas de plantas obtidas no Kristenbosh National Botanical Garden (Cape Town, South Africa), foram colhidas a 26/08/2007 e a 11/10/2007, respetivamente. Os *vouchers specimens* foram depositados no Herbário “João de Carvalho e Vasconcelos” do Instituto Superior de Agronomia, Lisboa (ISA), Portugal. 840/2007 (*P. xerophilus* Codd) e 914/2007 (*P. madagascariensis* (Pers.) Benth).

### 2.1.2 Metodologia de extração do material vegetal *P. xerophilus*

O extrato vegetal aquoso foi preparado usando 5 g de material vegetal (folha e caule) em pó, colocado em 100 mL de extrato cetónico a 10% m/v. O extrato foi obtido por ultrassons, o matraz com o material vegetal e com o solvente foi colocado num aparelho de ultrassons à temperatura ambiente, durante 15 minutos, para obter um maior rendimento de extração. Após esse tempo, a mistura foi filtrada e o solvente evaporado a pressão reduzida, a 40°C.

Realizou-se também uma Análise Cromatográfica ao extrato obtido a fim de identificar os compostos presentes no extrato (**Figura 6**).

### 2.1.3 Microrganismos

Os microrganismos usados neste estudo foram obtidos da American Type Culture Collection (ATCC) e incluíram 5 espécies bacterianas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Os microrganismos foram cultivados a 37°C em meio de cultura Mueller-Hinton. <sup>38</sup>



## **2.2 Atividade Antioxidante**

### **2.2.1 Reagentes e solventes**

Dimetilssulfóxido (DMSO) 99,9%, metanol p.a. e 2,2-difenil-1-picrihidrazilo (DPPH).

### **2.2.2 Ensaio de atividade antioxidante**

O ensaio da atividade antioxidante consistiu na adição do extrato da planta a uma solução metanólica de DPPH a 0,002% (m/v). A mistura foi incubada durante 30 minutos, à temperatura ambiente. A absorvância foi medida a 517 nm, contra o branco correspondente. A atividade antioxidante foi calculada pela fórmula  $\%AA = [(A_{DPPH} - A_{amostra}) / A_{DPPH}] \times 100$ , em que AA se trata da atividade antioxidante,  $A_{DPPH}$  a absorção da solução de DPPH contra o branco e  $A_{amostra}$  a absorção do extrato da planta contra o branco.<sup>39, 40</sup> Os testes foram realizados em triplicado.

## **2.3 Atividade Antimicrobiana**

### **2.3.1 Método da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI)**

Foi colocado 100 µL de meio Mueller-Hilton em cada poço de uma microplaca de 96 poços, sob condições assépticas. Ao primeiro poço de cada fila foram adicionados 100 µL de extrato (concentração de 1 mg/mL), bem como o controlo positivo (vancomicina para bactérias Gram-positivas e norfloxacina para bactérias Gram-negativas) ou negativo (DMSO). Com a micropipeta multicanal foram realizadas microdiluições na proporção 1:2 em série. Foi colocado 10 µL de uma suspensão bacteriana padronizada em cada um dos poços, correspondendo a 0,5 McFarland de cada micro-organismo. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Através de um leitor de microplacas de absorvância foi avaliado o crescimento microbiano a 620 nm.<sup>24</sup>

### **2.3.2 Método da determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Para a realização deste ensaio foi recolhido meio dos poços que não apresentaram crescimento após a realização do ensaio CMI. O meio recolhido foi colocado em novas placas de meio Mueller-Hilton estéril, para bactérias. As novas placas contendo as bactérias foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, foi registada a concentração mais baixa, na qual não foi observado crescimento como CBM.<sup>41</sup>

## 2.4 Metodologia de extração do óleo da *P. madagascariensis*

Para a preparação da extração foi pesado 46,86 g de *P. madagascariensis* seca (sobretudo folhas). O conteúdo pesado foi colocado num *Clevenger apparatus* e emergido num 1L de água destilada, posteriormente submetendo a hidrodestilação.

O óleo obtido da extração foi congelado, para facilitar a separação da água. Após a congelação da mesma foi realizada a filtração do óleo. O filtrado foi levado ao Evaporador Rotativo, para possibilitar a pesagem do composto.

Foi realizada uma Análise Cromatográfica, para se perceber quais os compostos possivelmente presentes no óleo essencial.<sup>22</sup>

## 2.5 Metodologia de isolamento da 6,7-dehidroroileanona

Procedeu-se ao isolamento do nosso composto de interesse, a 6,7-dehidroroileanona, através de uma Coluna de Cromatografia a Seco.<sup>22</sup> Esta consiste num funil com poros de diâmetro de 50 mm, no qual é colocado 25 g de sílica (1.07734.1000; Merck), o óleo filtrado (diluído na menor quantidade de hexano possível) é colocado num funil no topo da coluna. De seguida são colocados diversos eluentes, conforme são retiradas as frações.

Após a obtenção das diversas frações foi realizada uma nova Análise Cromatográfica de Camada Fina a fim de se perceber quais as frações de interesse (contendo a 6,7-dehidroroileanona). Foi realizada uma nova coluna com essas frações. Após a repetição do processo, as novas frações obtidas foram recristalizadas.<sup>22</sup>

## 2.6 Ensaio da Toxicidade Geral em *Saccharomyces cerevisiae*

O ensaio da toxicidade eucariótica geral em *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado tendo como referência o método desenvolvido pelos Professores Doutores Roberto e Caetano.<sup>35</sup>

Um inóculo de *S. cerevisiae* foi adicionado a 20 mL de YPD em meio líquido, num *Erlenmeyer* estéril. O mesmo foi a incubar por 16 a 24 h, a uma temperatura de 30°C, com agitação de 230 ciclos por min. Após o tempo de incubação, foi medida a absorvância da solução num espectrofotómetro de UV-Visível, a 525 nm, diluindo a solução com YPD a fim de se obter uma absorvância de 0,2 mUA (aproximadamente 10<sup>7</sup> unidades de colónia formadas (UCF) por mL). De seguida foi colocado 2 mL da solução diluída de levedura e 0,2 mL de amostra ou de controlo em cuvetes de plástico de 4 mL. Estas foram novamente a incubar por 6 h, a 30°C, sobre agitação de 230 ciclos por min. A cada 30 min foi ressuspensa a cultura de leveduras por 3 s no *vortex*, de seguida a absorvância foi medida, sempre a 520 nm. Foi realizada uma curva de crescimento, tanto para o controlo, como para a amostra. O declive da

fase de crescimento foi calculado. A seguinte fórmula foi utilizada para determinar a percentagem de inibição de crescimento:

$$GI\% = \frac{m_{\text{sample}}}{m_{\text{control}}} \times 100$$

GI% corresponde à inibição do crescimento em percentagem,  $m_{\text{amostra}}$  corresponde ao declive da curva da fase exponencial de crescimento da nossa amostra (cultura de leveduras) e  $m_{\text{controlo}}$  corresponde ao declive da zona exponencial de crescimento do nosso controlo.<sup>24,35</sup>

Este ensaio já foi realizado para o extrato da *P. madagascariensis* em outros artigos, como é o exemplo *Rijo et al.* 2014, no qual não foi verificada toxicidade.<sup>24</sup>

### **Capítulo 3. Resultados e Discussão**

Neste trabalho foram realizados extratos das plantas *P. madagascariensis* e *P. xerophilus* e avaliados os estudos da sua atividade antimicrobiana. O extrato acetónico de *P. xerophilus* foi preparado pelo método de extração por ultrassons (10% m/v). Os óleos essenciais de *P. madagascariensis* foram obtidos por hidrodestilação (método de Clevenger).

### 3.1 Extrato de *P. xerophilus*

O primeiro extrato realizado foi o da planta *P. xerophilus*, sendo que foram realizadas três extrações pelo método de ultrassons.

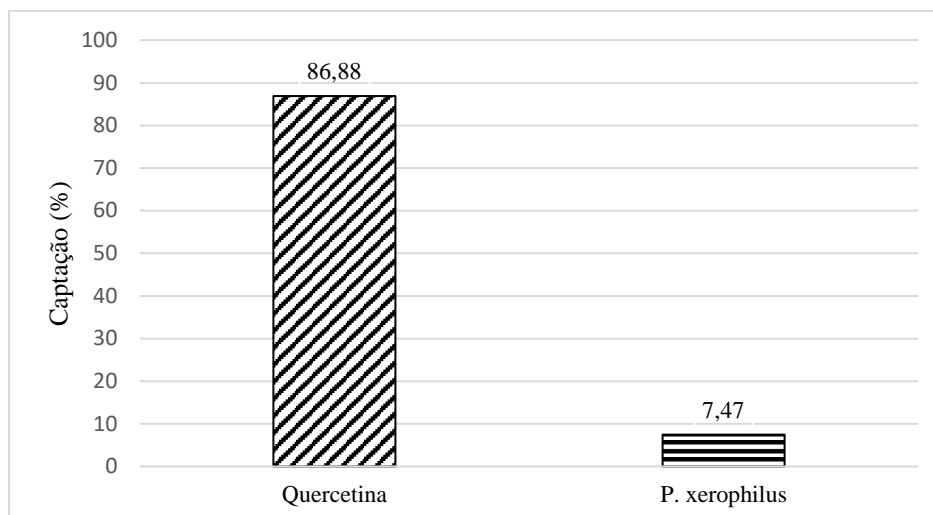
Extração	Massa (g)
1 <sup>a</sup>	0,30
2 <sup>a</sup>	0,28
3 <sup>a</sup>	0,26
<b>Rendimento total</b>	5,17 % (massa de folhas pesada/massa de extração)

**Tabela 1.** Peso e rendimento do extrato da *P. xerophilus*

As extrações originaram os resíduos apresentados na **tabela 1**, sendo que a 1<sup>a</sup> extração foi aquela na qual se obteve maior quantidade de resíduo de extrato, como era de esperar. O rendimento de extração obtido foi baixo. Uma vez que não existem estudos realizados sobre esta planta, não existem termos de comparação para com os resultados obtidos.

### 3.2 Ensaio da Atividade Antioxidante da *P. xerophilus*

O DPPH é um radical livre estável com potencialidade de reagir com componentes capazes de doar H<sup>+</sup>, sendo assim o composto utilizado para avaliar a atividade antioxidante dos compostos, nomeadamente do extrato de *P. xerophilus*. A atividade antioxidante do extrato foi qualitativamente determinada utilizando o ensaio de radical DPPH em TLC.<sup>23,42</sup>



**Gráfico 1.** Atividade antioxidante do extrato da *P. xerophilus* à concentração de 10 µg/mL.

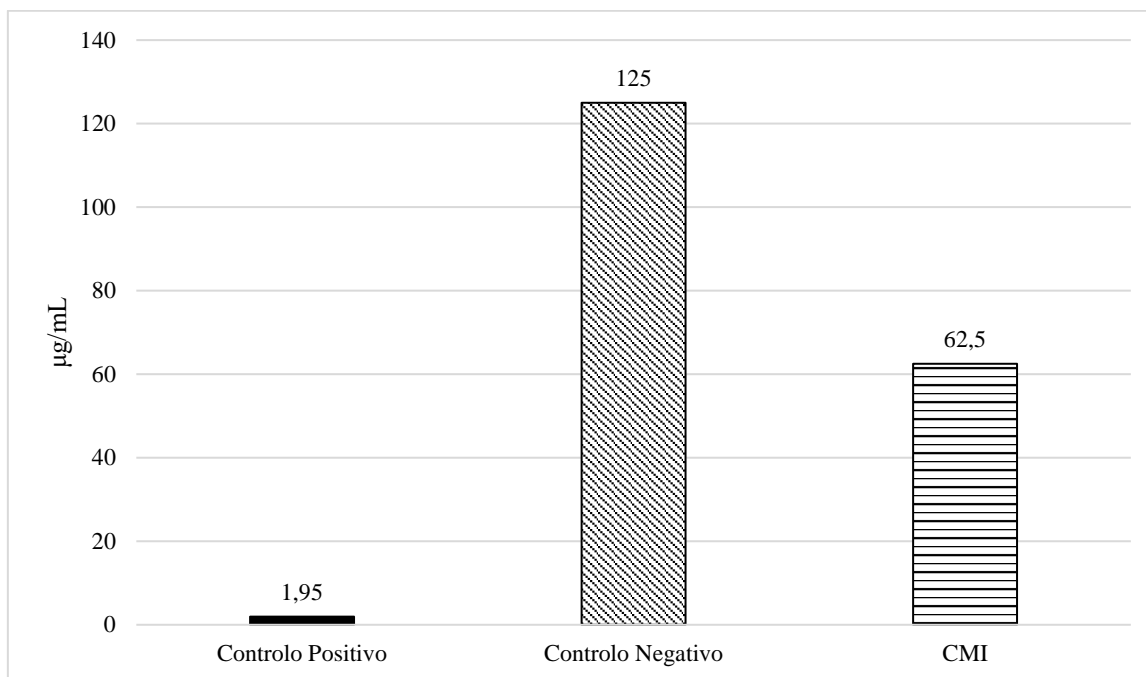
Apesar de se ter obtido um valor positivo, este foi muito baixo (7,47%), como podemos comprovar no **gráfico 1**. Uma vez mais por não existirem estudos realizados sobre esta planta, não possuímos termos de comparação.

### 3.3 Ensaio da Atividade Antimicrobiana da *P. xerophilus*

A atividade antimicrobiana dos extratos preparados foi avaliada, pelo método de microdiluição contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 3.3.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Através de um leitor de microplacas de absorvância foi avaliado o crescimento microbiano a 620 nm.<sup>24</sup> Para a realização do ensaio da CBM foi recolhido meio dos poços que não apresentaram crescimento após a realização do ensaio CMI.



**Gráfico 2.** Valores da concentração mínima inibitória do extrato de *P. xerophilus*.

O extrato aquoso de *P. xerophilus* demonstrou atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, tendo uma concentração mínima inibitória (CMI) de 62,5 µg/mL, como podemos ver no **gráfico 2**. O extrato aquoso do composto não é bactericida, uma vez que não inibiu a bactéria no ensaio da concentração mínima inibitória, contudo, é bacteriostático, pois inibiu o seu crescimento.

### 3.4 Extrato da *P. madagascariensis*

O segundo extrato realizado foi o da planta *P. madagascariensis*, sendo que foram realizadas várias extrações, o conteúdo pesado foi colocado num *Clevenger apparatus* e emergido num 1L de água destilada, posteriormente submetido a hidrodestilação.

Extração	Massa (g)
Óleo essencial	0,54
Rendimento	1,15 % (massa de óleo obtida/massa de planta seca)

**Tabela 2.** Peso e rendimento do óleo essencial extraído da *P. madagascariensis*

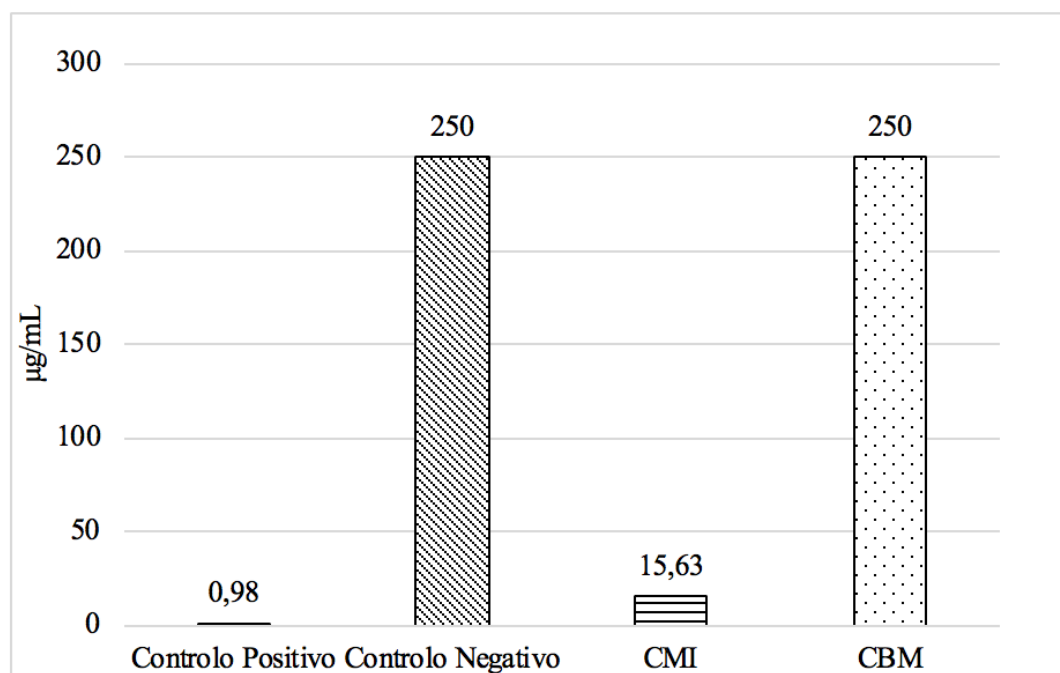
Foram realizadas várias extrações originando o resíduo que está apresentado na **tabela 2**. O total da junção do óleo das extrações resultou num peso de 0,54 g. O rendimento de extração obtido foi moderado, 1,15% (m/m). Quando comparado com *Garcia et al.* 2018 (16,49%), trata-se de um rendimento baixo, contudo, a experiência não foi realizada sob as mesmas condições, uma vez que foram realizadas menos extrações e num espaço de tempo mais curto.

### 3.5 Ensaio da Atividade Antimicrobiana da *P. madagascariensis*

A atividade antimicrobiana dos extratos preparados foi avaliada, pelo método de microdiluição contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 3.5.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Através de um leitor de microplacas de absorvância foi avaliado o crescimento microbiano a 620 nm.<sup>24</sup> Para a realização do ensaio da CBM foi recolhido meio dos poços que não apresentaram crescimento após a realização do ensaio CMI.



**Gráfico 3.** Resultados da Atividade Antimicrobiana da *P. madagascariensis*



O extrato, em forma de óleo essencial, da *P. madagascariensis* demonstrou atividade antimicrobiana contra *E. faecalis*, possuindo uma concentração mínima inibitória (CMI 15,63 µg/mL), como podemos comprovar no **gráfico 3**. O extrato do composto demonstra alguma atividade bacteriostática. Quando comparado com a literatura, em *Matias et al.* 2019, podemos verificar que o CMI obtido através de maceração em extrato acetónico obteve um resultado semelhante de CMI contra *S. aureus*, apesar de não ser o mesmo tipo de extrato. Apesar dos nossos resultados pouco favoráveis, quando analisados os resultados obtidos por *Matias et al.* 2019, podemos verificar que o extrato acetónico da planta possui uma elevada atividade antimicrobiana contra gram-negativos, nomeadamente contra *Klebsiella pneumoniae*, possuindo uma CMI inferior a 0,48 µg/mL.<sup>43</sup>

### 3.6 Isolamento da 6,7-dehidroroileanona

Procedeu-se ao isolamento do nosso composto de interesse, a 6,7-dehidroroileanona, através de uma Coluna de Cromatografia a Seco.<sup>22</sup>

Frações	Massa (g)
1-3	0,11
4-13	0,63
14-24	0,09

**Tabela 3.** Peso da junção das frações obtidas da coluna de fracionamento.

Após a realização da coluna de fracionamento, foram obtidas 3 junções de frações, 1-3, fração anterior à presença de 6,7-dehidroroileanona; 4-13, frações contendo o composto pretendido 6,7-dehidroroileanona; por fim as frações 14-24 são as posteriores ao aparecimento da 6,7-dehidroroileanona, demonstradas na **tabela 3**. Foi realizada uma nova coluna de fracionamento com as frações 4-13, contendo 6,7-dehidroroileanona.

#### 3.6.1 Recristalização

Após a realização da segunda coluna de fracionamento, foram obtidas novas frações, contendo a 6,7-dehidroroileanona (11-18), **tabela 4**. Com as frações obtidas, foi realizado o processo de recristalização.

Frações	Massa (g)
11-18	0,19

**Tabela 4.** Massa da junção das frações 11-18, contendo 6,7-dehidroroileanona.

Realizada a recristalização, os cristais foram pesados e efetuou-se o rendimento em comparação com o peso de planta inicialmente pesado.

<b>Massa da 6,7-dehidrooleanona</b>	0,09 g
<b>Rendimento</b>	47,28 %

**Tabela 5.** Peso e rendimento da 6,7-dehidrooleanona recristalizada.

Foi obtido um rendimento de recristalização do composto satisfatório, sendo este de 47,28%, como podemos comprovar na **tabela 5**.

## **Capítulo 4. Conclusão**

No presente estudo foram analisadas as plantas *Plectranthus xerophilus* Codd e *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth (família *Lamiaceae*). Foram analisados, de forma comparativa, o extrato aquoso da planta *Plectranthus xerophilus* e o extrato da planta *Plectranthus madagascariensis*, com o intuito de avaliar as suas possíveis utilizações terapêuticas. Diferentes métodos de extração foram considerados para cada planta, de forma a rentabilizar as extrações e assim obter um melhor rendimento.

O extrato da planta *P. xerophilus* (por ultrassons em extrato cetónico 10% m/v) demonstrou possuir atividade antimicrobiana (valor de CMI 62,5 µg/mL) contra a bactéria *S. aureus*.

O extrato da *P. madagascariensis* (por hidrodestilação em água destilada) demonstrou possuir atividade antimicrobiana (valor de CMI 15,63 µg/mL), também contra *E. faecali*. Os restantes ensaios não demonstraram atividade relevante em comparação com os controlos positivos. Uma vez que a *P. madagascariensis* exibiu atividade antimicrobiana, procedeu-se ao isolamento do composto maioritário existente no seu óleo essencial, a *6,7-dehidroroileanona*, do qual se obteve um rendimento massa/massa (massa composto/massa extrato) satisfatório (47,28 %).

Tendo por base os resultados obtidos relativamente ao óleo essencial e ao seu composto maioritário, a *6,7-dehidroroileanona*, novos estudos devem ser realizados a fim de desvendar outras potenciais bioatividades e para identificação de novos compostos bioativos presentes no óleo, a fim do desenvolvimento de novos fármacos.

## **Capítulo 5. Bibliografia**

1. WHO | Cancer. WHO. 2019. <https://www.who.int/cancer/en/>. Accessed July 3, 2019.
2. Banydeen R, Rose AMC, Martin D, Aiken W. Advancing Cancer Control Through Research and Cancer Registry Collaborations in the Caribbean. 2015;22(4). doi:10.1177/107327481502200420
3. Plenderleith IH. Clinical Practice Treating the Treatment: Toxicity of Cancer Chemotherapy.
4. Tewary P, Gunatilaka AAL, Sayers TJ. Using natural products to promote caspase - 8 - dependent cancer cell death. *Cancer Immunol Immunother*. 2016. doi:10.1007/s00262-016-1855-0
5. Koduru S, Grierson DS, Afolayan AJ. Ethnobotanical information of medicinal plants used for treatment of cancer in the Eastern Cape Province, South Africa. *Curr Sci*. 2007;92(7):906-908.
6. Mbele MM, Hull RR, Dlamini ZZ. African medicinal plants and their derivatives: Current efforts towards potential anti- cancer drugs. *Exp Mol Pathol*. 2017. doi:10.1016/j.yexmp.2017.08.002
7. Rocha AB da, Lopes RM, Schwartzmann G. Natural products in anticancer therapy. 2001;1(4):364-369.
8. Mayzlish-Gati E, Fridlender M, Nallathambi R, Selvaraj G, Nadarajan S, Koltai H. Review on Anti-Cancer Activity in Wild Plants of the Middle East. *Curr Med Chem*. 2018;25(36):4656-4670. doi:10.2174/0929867324666170705113129
9. Lichota A, Gwozdziński K. Anticancer Activity of Natural Compounds from Plant and Marine Environment. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3533. doi:10.3390/ijms19113533
10. Akaberi M, Mehri S, Iranshahi M. Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from *Salvia* species. *Fitoterapia*. 2015;100:118-132.
11. Garcia C, Teodósio C, Oliveira C, Oliveira C, Díaz-lanza A, Reis C. Naturally Occurring *Plectranthus* -derived Diterpenes with Antitumoral Activities. 2018:1-30. doi:10.2174/1381612825666190115144241
12. Xu H, Liu L, Fan X, Zhang G, Li Y, Jiang B. Identification of a diverse synthetic abietane diterpenoid library for anticancer activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2016:1-6. doi:10.1016/j.bmcl.2016.12.032
13. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod*. 2016;79(3):629-661. doi:10.1021/acs.jnatprod.5b01055
14. M. Greenwell, P.K.S.M. Rahman. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int J Pharm Sci Res*. 2015;6(10):4103-4112.

15. Paclitaxel monograph. In: *BC Cancer Agency Cancer Drug Manual*. Vancouver: British Columbia; 2016:1-10.
16. Vincristine monograph. In: *BC Cancer Agency Cancer Drug Manual*. Vancouver: British Columbia; 2008:1-9.
17. Vinblastine monograph. In: *BC Cancer Agency Cancer Drug Manual*. Vancouver: British Columbia; 2008:1-8.
18. Topotecan monograph. In: *BC Cancer Agency Cancer Drug Manual*. Vancouver: British Columbia; 2017:1-7.
19. Waldia S, Joshi BC, Pathak U, Joshi MC. The genus *plectranthus* in India and its chemistry. *Chem Biodivers*. 2011;8(2):244-252. doi:10.1002/cbdv.201000048
20. Rice LJ, Brits GJ, Potgieter CJ, Staden J Van. *Plectranthus*: A plant for the future? *South African J Bot*. 2011;77(4):947-959. doi:10.1016/j.sajb.2011.07.001
21. Grayer RJ, Eckert MR, Lever A, Veitch NC, Kite GC, Paton AJ. Distribution of exudate flavonoids in the genus *Plectranthus*. *Biochem Syst Ecol*. 2010;38(3):335-341. doi:10.1016/j.bse.2010.01.014
22. Garcia C, Silva CO, Monteiro CM, Nicolai M, Gonz I, Ana MD. Anticancer properties of the abietane by optimized extraction. 2018.
23. Kubínová R, Pořízková R, Navrátilová A, et al. Antimicrobial and enzyme inhibitory activities of the constituents of *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2014;6366:1-4. doi:10.3109/14756366.2013.848204
24. Rijo P, Matias D, Fernandes AS, Simões MF, Nicolai M. Antimicrobial Plant Extracts Encapsulated into Polymeric Beads for Potential Application on the Skin. 2014:479-490. doi:10.3390/polym6020479
25. Lukhoba CW, Simmonds MSJ, Paton AJ. *Plectranthus* : A review of ethnobotanical uses. 2006;103:1-24. doi:10.1016/j.jep.2005.09.011
26. Rijo P. PHYTOCHEMICAL STUDY AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF DITERPENES AND DERIVATIVES FROM PLECTRANTHUS SPECIES. 2010.
27. Areche C, Schmeda-Hirschmann G, Theoduloz C, Rodríguez JA. Gastroprotective effect and cytotoxicity of abietane diterpenes from the Chilean Lamiaceae *Sphacele chamaedryoides* (Balbis) Briq. *J Pharm Pharmacol*. 2009;61(12):1689-1697.
28. Ladeiras D, Monteiro C, Pereira F, Reis C, Afonso C, Rijo P. Reactivity of Diterpenoid Quinones: Royleanones. *Curr Pharm Des*. 2016;22(12):1682-1714. doi:10.2174/1381612822666151211094521
29. Ascensão L, Figueiredo AC, Barroso JG, et al. *Plectranthus madagascariensis*:

- Morphology of the Glandular Trichomes, Essential Oil Composition, and Its Biological Activity. *Int J Plant Sci.* 1998;159(1):31-38. doi:10.1086/297518
30. Gazim ZC, Rodrigues F, Amorin ACL, et al. New natural Diterpene-Type abietane from *Tetradenia riparia* Essential Oil with Cytotoxic and Antioxidant activities. *Molecules.* 2014;19(1):514-524.
  31. Kusumoto N, Aburai N, Ashitani T, Takahashi K, Kimura K. Pharmacological Prospects of Oxygenated Abietane-Type Diterpenoids from *Taxodium distichum* Cones. *Adv Biol Chem.* 2014;4(2):109-115.
  32. Choudhary MI, Hussain A, Ali Z, et al. Diterpenoids including a novel dimeric conjugate from *Salvia leriæfolia*. *Planta Med.* 2012;78(3):269-275.
  33. 2013 Book chapter 922-931.pdf.
  34. Soares DG, Andreazza AC, Salvador M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Bras Ciências Farm.* 2005;41(1):95-100. doi:10.1590/S1516-93322005000100011
  35. Roberto A, Caetano PP. A high-throughput screening method for general cytotoxicity part I - Chemical toxicity. *Rev Lusófona Ciências e Tecnol da Saúde.* 2005;2(2):95-100.
  36. Roque L V, Dias S, Cruz N, Roberto A. Design of Finasteride-Loaded Nanoparticles for Potential Treatment of Alopecia. 2017:197-204. doi:10.1159/000475473
  37. Rijo P, Ascensão L, Roberto A, Sofia A. Therapeutic Delivery. 2016;7(2001):287-304.
  38. Rijo P, Batista M, Matos M, Rocha H, Jesus S, Simões MF. Screening of antioxidant and antimicrobial activities on *Plectranthus* spp . extracts Pesquisa das actividades antioxidante e antimicrobiana em extractos de plantas do. 2012.
  39. Falé PL, Borges C, Amorim PJ, et al. Rosmarinic acid , scutellarein 4 O -methyl ether 7-O -glucuronide and ( 16S ) -coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (“ falso boldo ”). *Food Chem.* 2009;114(3):798-805. doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.015
  40. Oliveira C, Roberto A, Rijo P. Biological activity screening of seven *Plectranthus* species Pesquisa de actividade biológica de sete espécies de *Plectranthus*. 2017. doi:10.19277/bbr.14.1.153
  41. Neto Í, Andrade J, Fernandes AS, et al. Multicomponent Petasis-borono Mannich Preparation of Alkylaminophenols and Antimicrobial Activity Studies. *ChemMedChem.* 2016:1-10. doi:10.1002/cmdc.201600244
  42. Wagemaker TAL, Fernandes AS, Grande C, Lisboa U De, Lisboa U De. Evaluation of



- antioxidant and antimicrobial activities of green coffee oil in cosmetic formulations  
Avaliação das actividades antioxidante e antimicrobiana do óleo de café verde em formulações cosméticas. 2012.
43. Matias D, Nicolai M, Fernandes AS, et al. biomolecules Comparison Study of Different Extracts of *Plectranthus madagascariensis*, *P. neochilus* and the Rare *P. porcatus* (Lamiaceae): Chemical Characterization, Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic Activities. :1-13.