

Evaluation of diterpenoids from *P. ornatus* as potential COX-1 inhibitors

Avaliação de diterpenos isolados de P. ornatus como potenciais inibidores da COX-1

Patrícia Rijo^{1,2}, Ana Sofia Fernandes^{1,2}, Fátima Simões² & Lídia Pinheiro²

¹ CBios - Research Center for Health Sciences & Technologies (Lab. Pharmacology and Therapeutics), U Lusófona, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa, Portugal

² Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences (iMed.UL), Universidade de Lisboa - Fac. Farmácia, , Av. Prof. Gama Pinto, 1649-003 Lisboa, Portugal
Email: catarina.reis@ulusofona.pt

Abstract

Natural products are a rich source of drug candidates for clinical use. The *Plectranthus ornatus* Codd. belongs to a genus associated to the isolation of diterpenoids which are responsible for various biological activities. The three diterpenoids under study were isolated in the past from *P. ornatus* and are now being evaluated as potential COX-1 inhibitors. Obtained results suggest that rhinocerotoic acid (2), but not halimane (3) and plectronatin C (1), has a mild COX-1 inhibitory activity. Current studies are being carried out to understand if these compounds have effect as COX-2 inhibitors. This will contribute to establish their possible interest as anti-inflammatory agents.

Keywords: *Plectranthus ornatus*, diterpenoids, COX-1 inhibitors

Resumo

Os produtos naturais são uma importante fonte de possíveis novos fármacos para uso clínico. O *Plectranthus ornatus* Codd. pertence a um género associado ao isolamento de diterpenos que são compostos responsáveis por diversas actividades biológicas. Os três diterpenos em estudo foram isolados no passado de *P. ornatus* e são agora avaliados como potenciais inibidores da COX-1. Os resultados obtidos sugerem que o ácido rinocerotoico (2), mas não a plectronatina C (1) e o halimano (3), apresenta uma ligeira actividade inibidora da COX-1. Estudos em desenvolvimento visam entender se estes compostos têm efeito como inibidores da COX-2. Deste modo, pretende-se verificar o seu possível interesse como agentes anti-inflamatórios.

Palavras-chave: *Plectranthus ornatus*, diterpenos, inibidores da COX-1

Introduction

Plants used in traditional medicine, provide an enormous source of novel bioactive compounds and, therefore, *in vitro* pharmacological investigations of plant-based drug candidates are needed to unravel or to validate their efficacy and safety^[1]. Many *Plectranthus* species (Lamiaceae family) are plants of ornamental, economical and medicinal interest. Several species are used in tropical Africa and Polynesia as vermicides, antiseptics and purgatives, for the treatment of ear infections, toothache and stomach ache, as a remedy for vomiting, nausea and against a vast array of other diseases^[2]. Some Africa native *Plectranthus* species were introduced in the New World, following the Portuguese Discoveries (16th century), and *P. ornatus* (Fig. 1) was one of them. Despite *P. ornatus* has little use in the traditional medicine of African countries, it is used as an ethnomedicinal plant (under the ethnobotanical generic name of *boldo*) in some Brazil regions. Besides the ethnopharmacological applications for digestive purposes, their leaves are also used for their antibiotic action^[3]. The genus *Plectranthus* comprises ca. 300 species. Their constituents are mainly diterpenoids that belong to abietane, kaurane, and labdane classes, royleanone abietanes being a well-represented subclass^[4]. Previous studies on the secondary metabolites of *Plectranthus ornatus* Codd. reported the isolation of labdane, clerodane and halimane diterpenoids^[2,5-7], but the pharmacological properties of such compounds still remain unknown.

Introdução

As plantas utilizadas em medicina tradicional constituem uma enorme fonte de novos compostos bioativos. A investigação das propriedades farmacológicas de potenciais fármacos derivados de plantas é assim necessária para elucidar ou validar a sua eficácia e segurança^[1]. Muitas espécies de *Plectranthus* (família Lamiaceae) são plantas de interesse ornamental, medicinal e económico. Diversas espécies são usadas na África tropical e na Polinésia, como vermícidias, anti-sépticos e purgativos, para o tratamento de infecções do ouvido, dor de dentes e de estômago, náuseas, vômitos e contra uma vasta gama de outras doenças^[2]. Algumas espécies de *Plectranthus* nativas de África como o *P. ornatus* (Fig. 1), foram introduzidas no Novo Mundo através dos Descobrimentos Portugueses (século XVI). Apesar de *P. ornatus* ter pouco uso na medicina tradicional nos países africanos, em algumas regiões do Brasil, é utilizada como uma planta etnomedicinal (sob o nome genérico etnobotânico de *boldo*). Além das aplicações etnofarmacológicas para doenças digestivas, as folhas são também usadas pela sua ação antibiótica^[3]. O género *Plectranthus* compreende cerca de 300 espécies. Os seus constituintes são principalmente diterpenos, com esqueletos de abietano, de kaurano e de labdano, onde a sub-classe royleanona está bem representada^[4]. Estudos anteriores sobre os metabolitos secundários de *Plectranthus ornatus* Codd. relatam o isolamento de diterpenos com esqueleto de labdano, de clerodano e de halimano^[2,5-7], mas as propriedades farmacológicas destes compostos permanecem em grande parte desconhecidas.



Figure 1 - *Plectranthus ornatus* Codd.^[12,16]
Figura 1 - *Plectranthus ornatus* Codd.^[12,16]

Cyclooxygenase enzymes (COX) catalyze the conversion of arachidonic acid to prostaglandin (PG) H₂, the precursor of PGs and thromboxane. These mediators play important roles in inflammation and pain, as well as in normal physiological functions^[8]. COX exists in two isoforms (COX-1 and COX-2) physiologically distinct. COX-1 is generally constitutive and plays housekeeping functions including gastric protection and platelet aggregation. In fact, COX-1 is responsible for the synthesis of the pro-aggregant thromboxane in blood platelets, being a druggable target for anti-aggregant therapy. However, the excessive inhibition of COX-1 may lead to adverse effects on the gastrointestinal mucosa, which may cause gastric ulceration, and increase the risk of adverse cardiovascular events^[1]. COX-2 is mostly inducible and is responsible for the biosynthesis of PGs under acute inflammatory conditions^[1]. The inhibition of this enzyme constitutes the main mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). NSAIDs efficiency is well established, but there is still a need for therapeutic alternatives, and medicinal plants could potentially serve as leads in the production of new drugs for treating pain and inflammation with reduced side effects.

Different plant-derived compounds were previously shown to inhibit COX-1 and/or COX-2^[9]. In the present work, we have evaluated the potential role of three diterpenoids isolated from *P. ornatus* as COX-1 inhibitors. This information is of great importance since, as above mentioned, COX-1 inhibitors may be useful as anti-aggregant agents. On the other hand, if a given compound inhibits COX-2 without interfering with COX-1, it will be advantageous as an anti-inflammatory drug. This work is a preliminary approach to unravel the pharmacological interest of these diterpenoid compounds.

Material and Methods

Extraction and isolation of diterpenoids from P. ornatus

P. ornatus Codd. was cultivated in the Faculty of Pharmacy Hortum (Universidade de Lisboa), from seeds provided by the Herbarium of the Lisbon's Botanical Garden, Portugal. Dried and powdered *P. ornatus* whole plants were extracted with Me₂CO (acetone) as previously described^[6]. Repeated chromatographic processes on the acetone extract of *P. ornatus* whole plant, allowed the isolation of the three

As enzimas ciclooxigenase (COX) catalisam a conversão de ácido araquidónico em prostaglandina (PG) H₂, precursora de PGs e tromboxano. Estes mediadores desempenham um papel importante na inflamação e dor, assim como também em funções fisiológicas^[8]. A COX existe em duas isoformas (COX-1 e COX-2) fisiologicamente distintas. A COX-1 é geralmente constitutiva e desempenha diversas funções incluindo a protecção gástrica e a agregação plaquetária. De facto, a COX-1 é responsável pela síntese do tromboxano ao nível das plaquetas, o qual exerce uma acção pró-agregante. Assim, a COX-1 é um importante alvo terapêutico em tratamentos anti-agregantes. No entanto, uma inibição excessiva da COX-1 pode levar a efeitos adversos na mucosa gastrointestinal, podendo causar ulceração gástrica, e pode também aumentar o risco de efeitos adversos cardiovasculares^[1]. A COX-2 é uma enzima essencialmente indutiva, sendo responsável pela biossíntese de PGs em situações agudas de inflamação^[1]. A inibição desta enzima constitui o principal mecanismo de acção dos fármacos anti-inflamatórios não esteroides (AINEs). Apesar da eficácia dos AINEs estar bem estabelecida, há ainda necessidade de alternativas terapêuticas. As plantas medicinais poderão assim constituir a base para a produção de novos fármacos para o tratamento da dor e inflamação, com efeitos secundários reduzidos.

Em estudos anteriores, vários compostos derivados de plantas demonstraram inibir a COX-1 e/ou a COX-2^[9]. Neste trabalho avaliou-se o potencial papel de três diterpenos isolados de *P. ornatus* como inibidores da COX-1. Esta informação é importante pois, como referido, os inibidores da COX-1 poderão ser úteis como agentes anti-agregantes. Por outro lado, se um determinado composto inibir a COX-2 sem interferir com a COX-1, poderá ser vantajoso como fármaco anti-inflamatório. Este trabalho constitui assim uma abordagem inicial para avaliar o interesse farmacológico destes compostos diterpénicos.

Materiais e Métodos

Extração e isolamento de diterpenos a partir de P. ornatus

A espécie *P. ornatus* Codd. foi cultivada no Hortum da Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, a partir de sementes fornecidas pelo Herbário do Jardim Botânico de Lisboa, Portugal. As plantas inteiras de *P. ornatus* foram secas, pulverizadas e extraídas com Me₂CO (acetona), como descrito anteriormente^[6]. A repetição de diversos processos cromatográficos do extrato acetónico da planta inteira de *P. ornatus*,

diterpenoids. Final purification on preparative thin layer chromatography (ptlc) plates [Si gel] and crystallization yielded pure plectronatin C (Fig. 2,1, 1 α ,6 β -diacetoxy-8 α ,13R*-epoxy-14-labden-11-one)^[6], rhinocerotoic acid (Fig. 2,2, 7-oxo-labda-8-13E-dien-15-oic acid)^[7] and halimane (Fig. 2,3, 11R*-acetoxihalima-5,13E-dien-15-oic acid)^[7]. The structures of the compounds were mainly established by spectroscopic means, particularly by 1D and 2D NMR spectroscopic studies.

permitiu o isolamento dos três diterpenos em estudo. A purificação final por cromatografia de camada delgada preparativa (ccd) [Si gel] e cristalização resultou no isolamento dos diterpenos puros de plectronatina C (Fig. 2,1, 1 α , 6 β -diacetoxi-8 α , 13R *-epoxi-14-labden-11-ona)^[6], ácido rinocerotoico (Fig. 2, 2, ácido 7-oxo-labda-8-13E-dieno-15-óico)^[7] e halimano (Fig. 2, 3; 11R *-acetoxi-halima-5, 13E-dieno-15-óico)^[7]. As estruturas dos compostos foram estabelecidas principalmente por meios espectroscópicos, particularmente por estudos de RMN 1D e 2D.

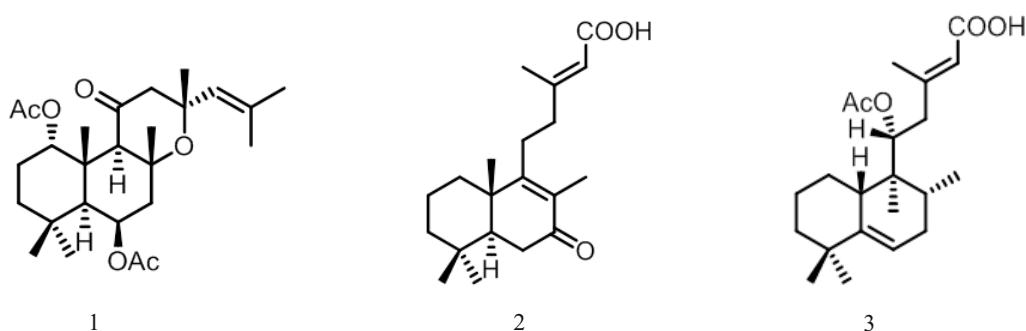


Figure 2 – Chemical structures of plectronatin C (1), rhinocerotoic acid (2) and halimane (3).
Figura 2 – Estruturas químicas de plectronatina C (1), ácido rinocerotoico (2) e halimano (3).

Evaluation of COX-1 inhibitory activity

The three diterpenoids, isolated as described above, were tested for their potential COX-1 inhibitory activity using the Colorimetric COX (ovine) Inhibitor Screening Assay Kit (Catalog No. 760111) from Cayman Chemical. This functional assay measures the peroxidase component of COX by monitoring the appearance of oxidized *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD)^[10]. The assay was carried out according to the manufacturer's instructions. The compounds under study were dissolved in DMSO and were tested over a wide range of concentrations, from 62.5 μ M to 2 mM (plectronatin C, **1**) or 4 mM (rhinocerotoic acid, **2** and halimane, **3**). Diclofenac, a recognized COX-1 inhibitor, was used as positive control. At the end of the assays, absorbance was read at 595 nm using an Anthos Zenyth 3100 microplate reader. Two independent experiments were carried out, each comprising three replicate wells.

Avaliação da actividade inibitória da COX-1

Os três diterpenos isolados como acima descrito foram estudados relativamente à sua potencial actividade inibitória da COX-1, utilizando o kit colorimétrico *COX (ovino) Inhibitor Screening Assay* (ref. 760111) da Cayman Chemical. Este ensaio funcional avalia a actividade peroxidase da COX, monitorizando o aparecimento da *N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilenodiamina oxidada^[10]. O ensaio foi executado de acordo com as instruções do fabricante. Os compostos em estudo foram dissolvidos em DMSO e foram testados numa vasta gama de concentrações, entre 62.5 μ M e 2 mM (plectronatina C, **1**) ou 4 mM (ácido rinocerotoico, **2** e halimano, **3**). O diclofenac, que possui reconhecida actividade inibitória da COX-1, foi utilizado como controlo positivo. No final dos ensaios, a absorvância foi lida a 595 nm, num leitor de microplacas Anthos Zenyth 3100. Realizaram-se dois ensaios independentes, cada um compreendendo três poços replicados.

Qualitative DPPH assay

Antioxidant compounds are known to interfere with the technique used to evaluate COX-1 activity. Therefore, these compounds under study were tested for their antioxidant properties, using a qualitative version of the DPPH assay. The three compounds (10 μ L of a 1000 μ M methanol solution) were loaded on a tlc plate [silica gel GF254] and eluted with *n*-hexane:AcOEt (7:3). After development and drying, the tlc plate was sprayed with a 0.2% DPPH solution in MeOH and examined 10 min later. Vitamin E was used as positive control^[11].

Results

Isolation of diterpenoids from *P. ornatus*

The studied diterpenoids, two labdanes plectornatin C (**1**) and rhinocerotinoic acid (**2**), and a halimane (**3**), have been isolated from an acetone extract of *P. ornatus*. Diterpenes with a halimane skeleton are rarely isolated and their pharmacologic properties remain unknown^[3]. After purification, the following yields were obtained - 544 mg of plectornatin C (**1**, 0.016% of dry plant material), 116 mg of rhinocerotinoic acid (**2**, 0.00342%), and 700 mg of halimane (**3**, 0.0286%)^[7,12].

COX-1 inhibitory activity

Results of the COX-1 inhibition assay are depicted in **Fig. 3**. As shown in **Fig. 3A**, rhinocerotinoic acid (**2**) moderately inhibited COX-1, decreasing this enzyme's activity in a dose-dependent way. A maximum effect was observed for the concentration of 4 mM, which led to a decrease in COX-1 activity to 57% of control. Halimane (**3**) and plectornatin C (**1**) did not exhibit considerable COX-1 inhibitory properties (Fig. 3B and 3C). These compounds, up to 4 mM (for halimane, **3**) or 2 mM (for plectornatin C, **1**), have shown only slight reductions of enzymatic activity (< 17 % inhibition) and no dose-response effects. It is also important to mention that the positive control diclofenac (31 μ M), under the same experimental conditions, dramatically decreased COX-1 activity to 7% of control value (data not shown).

Ensaio DPPH qualitativo

Os compostos com ação antioxidante interferem com a técnica utilizada para avaliar a atividade inibitória da COX-1. Assim, os compostos em estudo foram avaliados relativamente à sua capacidade antioxidante, através de uma versão qualitativa do ensaio DPPH. Procedeu-se à aplicação dos três compostos (10 μ L de uma solução a 1000 μ M em metanol) numa placa de ccd [silica gel, GF254], a qual foi eluída com *n*-hexano:AcOEt (7:3). Após desenvolvimento e secagem, a placa de ccd foi pulverizada com uma solução metanólica de DPPH 0,2% (p/v) e examinada 10 min depois. Utilizou-se a vitamina E como controlo positivo^[11].

Resultados

Isolamento de diterpenos a partir de *P. ornatus*

Os diterpenos em estudo, os dois labdanos plectornatina C (**1**) e ácido rinocerotinoico (**2**), e o halimano (**3**), foram isolados a partir de um extrato de acetona de *P. ornatus*. Os diterpenos com esqueleto de halimano são raramente isolados e as suas propriedades farmacológicas permanecem desconhecidas^[3]. Após purificação, os rendimentos obtidos foram os seguintes: 544 mg de plectornatina C (**1**, 0.016 % de material de planta seca); 116 mg de ácido rinocerotinoico (**2**, 0.00342 %) e 700 mg de halimano (**3**, 0.0286 %) ^[7,12].

Atividade inibitória da COX-1

Os resultados do ensaio de inibição da COX-1 são apresentados na Fig. 3. Como se mostra na Fig. 3A, o ácido rinocerotinoico (**2**) inibiu moderadamente a COX-1, diminuindo a actividade desta enzima de uma forma dose-dependente. O efeito máximo foi observado para a concentração de 4 mM, que reduziu a actividade COX-1 para 57% do controlo. O halimano (**3**) e a plectornatina C (**1**) não exibiram propriedades inibitórias da COX-1 consideráveis (Fig. 3B e 3C). Estes compostos, em concentrações até 4 mM (halimano, **3**) ou 2 mM (plectornatina C, **1**), levaram apenas a pequenas reduções na actividade enzimática (inibição < 17%), sendo que não se observaram efeitos dose-resposta. É também importante referir que o controlo positivo diclofenac (31 μ M), nas mesmas condições experimentais, diminuiu dramaticamente a actividade COX-1 para 7% do valor do controlo (dados não mostrados).

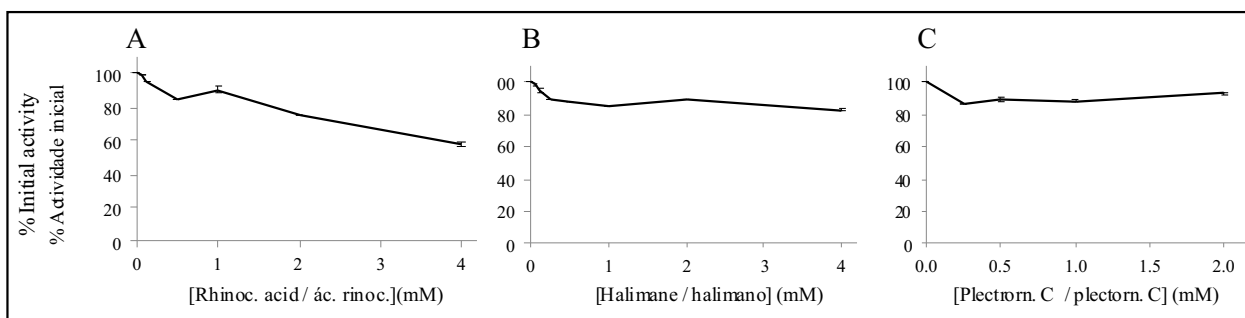


Figure 3 – Effect of (A) rhinocerotoic acid 2, (B) halimane 3, and (C) plectornatin C 1 on the activity of COX-1. Values represent mean \pm SD of two independent experiments and are expressed as percentages of initial enzymatic activity.

Figura 3 – Efeito do (A) ácido rinocerotoico 2, (B) halimano 3 e (C) plectornatina C 1 na actividade da COX-1. Os valores representam media \pm DP de duas experiências independentes e estão expressos como percentagens da actividade enzimática inicial.

Antioxidant activity

As shown in Fig. 4, the three studied diterpenoids did not reduce DPPH. A methodological interference with the COX-1 activity assay can therefore be excluded. It is important to mention that the positive control vitamin E led to a yellow spot against the purple background, indicating the reduction of DPPH and thus antioxidant activity.

Actividade antioxidante

Como apresentado na Fig. 4, os três diterpenos em estudo, não reduziram o radical DPPH. Deste modo, pode ser excluída uma possível interferência metodológica com o ensaio utilizado para avaliar a actividade COX-1. É importante referir que o controlo positivo, vitamina E, originou uma mancha amarela contra o fundo roxo, indicativa da redução do DPPH e, conseqüentemente, de actividade antioxidante.

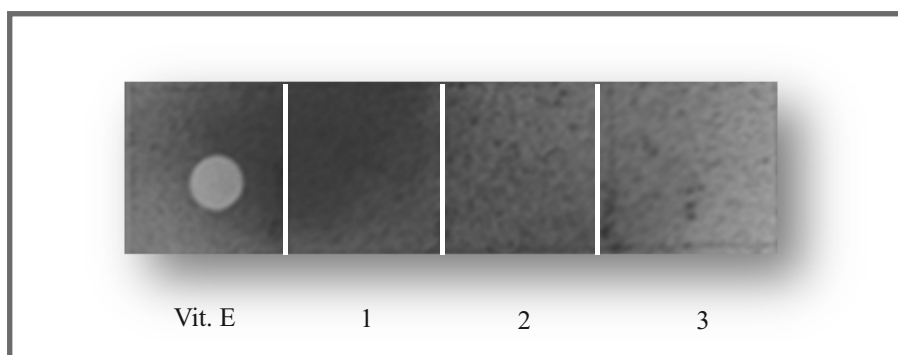


Figure 4 - TLC-DPPH bleaching assay of diterpenoids 1-3 and vitamin E (positive control).

Figura 4 – Ensaio qualitativo ccd-DPPH para os diterpenos 1-3 e para a vitamina E (controlo positivo).

Discussion

The screening of the isolated compounds from medicinal plants is motivated by the possibility to discover new biologically active chemotypes potentially useful in clinical practice. Therefore, after isolation, it is crucial to understand the pharmacological properties of these plant-based compounds. Previous studies have identified several plant-derived compounds, including labdane diterpenes, capable to inhibit COX-1 and/or COX-2^[9, 13]. In the present work, three diterpenoids isolated from *P. ornatus* were evaluated for a potential COX-1 inhibitory effect, using a functional assay, based in the peroxidase component of COX.

Halimane (**3**) and plectronatin C (**1**) did not considerably inhibit COX-1 under the conditions tested. Results suggested that a pharmacological use as COX-1 inhibitors for anti-aggregant therapy might be discarded. However, no effect over COX-1 may be beneficial for other therapeutic applications. Concerning NSAIDs, an inhibition of COX-2, and not COX-1, is desired. In fact, drugs that act as selective COX-2 inhibitors are potent anti-inflammatory agents, achieving relief from pain and inflammation, and less likely to cause gastric ulceration than non-selective NSAIDs^[14]. In this sense, it is important to evaluate the ability of halimane (**3**) and plectronatin C (**1**) to inhibit COX-2, in order to find out whether these diterpenoids could be useful to treat inflammatory conditions. It should be mentioned that several diterpenes of different types (labdane, kaurane, clerodane, abietane, and pimarane) were previously suggested to possess anti-inflammatory properties^[12, 15], encouraging the evaluation of other diterpenes for this therapeutical application.

Concerning rhinocerotoic acid (**2**), a COX-1 inhibitory effect was observed. However, this effect was very weak, much below the inhibition found for diclofenac, the non-selective NSAID used as positive control. Considering celecoxib, an NSAID classified as a selective COX-2 inhibitor due to its 600-fold selectivity for COX-2 over COX-1, an IC₅₀ of 30 µM for ovine COX-1 was previously reported^[9]. Although we are not able to determine the IC₅₀ for rhinocerotoic acid (**2**), our results indicate that this value is much higher (> 4 mM). The use of rhinocerotoic acid (**2**) as a COX-1 inhibitor for anti-aggregant therapy is thus not likely to be feasible. In previous studies, rhinocerotoic acid (**2**) was shown to possess anti-inflammatory activity in rats^[15]. Considering an anti-inflammatory therapeutic use, the slight COX-1 inhibitory effect of this compound, much below that reported for widely used NSAIDs, can be advantageous in terms of potential gastric side effects.

Discussão

A avaliação de compostos isolados de plantas medicinais é motivada pela possibilidade da descoberta de novos quimiotipos biologicamente activos para posterior uso clínico. Assim, após isolamento, é fundamental compreender as propriedades farmacológicas de compostos derivados de plantas. Estudos anteriores identificaram diversos compostos derivados de plantas, incluindo diterpenos com esqueleto de labdano, com capacidade de inibir a COX-1 e/ou a COX-2^[9, 13]. Neste trabalho, três diterpenos isolados de *P. ornatus* foram avaliados relativamente a um potencial efeito inibitório da COX-1, utilizando um ensaio funcional baseado na actividade peroxidase da COX.

A plectronatina C (**1**) e o halimano (**3**) não inibiram a COX-1 consideravelmente nas condições testadas. Estes resultados sugerem que a sua utilização farmacológica como inibidores da COX-1 para a terapêutica anti-agregante pode ser excluída. No entanto, a ausência de efeito sobre a COX-1 pode ser benéfica para outras aplicações terapêuticas. No que respeita a AINEs, pretende-se a inibição da COX-2, mas não da COX-1. De facto, fármacos que actuem como inibidores selectivos da COX-2 são agentes anti-inflamatórios potentes, permitindo o alívio da dor e inflamação, mas são menos propensos a causar ulceração gástrica que os AINEs não selectivos^[14]. Neste sentido, será agora importante avaliar a capacidade da plectronatina C (**1**) e do halimano (**3**) para inibir a COX-2, de modo a compreender se estes poderão ser úteis para tratar situações de inflamação.

Em relação ao ácido rinocerotoico (**2**), observou-se um efeito inibitório da COX-1. No entanto, este efeito foi fraco, bastante abaixo da inibição observada para o diclofenac, o AINE não selectivo usado como controlo positivo. Comparativamente ao celecoxibe, um AINE classificado como inibidor selectivo da COX-2 devido à sua actividade inibitória 600 vezes superior para a COX-2 relativamente à COX-1, foi anteriormente reportado um IC₅₀ de 30 µM para a COX-1 ovina^[9]. Apesar de não termos o valor de IC₅₀ para o ácido rinocerotoico (**2**), os nossos resultados indicam que esse valor será bastante superior (> 4 mM). A utilização de ácido rinocerotoico (**2**) como inibidor da COX-1 para terapêutica anti-agregante será assim pouco viável. Em estudos anteriores, o ácido rinocerotoico (**2**) demonstrou actividade anti-inflamatória em ratos^[15]. Considerando uma utilização terapêutica como anti-inflamatório, o ligeiro efeito inibitório face à COX-1, bastante abaixo do reportado para AINEs de uso comum, poderá ser vantajoso em termos de possíveis efeitos secundários a nível gástrico.

Conclusion

Obtained results suggest that rhinocerotoic acid (**2**), but not plectranatin C (**1**) and halimane (**3**), has a mild COX-1 inhibitory activity. Future studies should be further developed, in order to confirm these data by different methodologies. Complementary work is in progress to understand whether these compounds might act as COX-2 inhibitors. This will shed light on their possible interest as anti-inflammatory agents.

Acknowledgments

The authors acknowledge Benjamín Rodríguez, Marisa Nicolai and "Fundação para a Ciência e a Tecnologia" (Ph.D. grant no. SFRH/BD/19250/2004, P.R.).

Conflict of interests

The authors declare that there are no financial and personal relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interests.

Conclusões

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que o ácido rinocerotoico (**2**), mas não a plectranatina C (**1**) e o halimano (**3**), tem um ligeiro efeito inibitório da COX-1. Futuramente, deverão ser realizados estudos para confirmar estes dados através de metodologias distintas. Além disso, estão a ser realizados estudos com o objectivo de avaliar se estes compostos têm efeito como inibidores da COX-2. Estes dados serão elucidativos relativamente ao possível interesse destes agentes como anti-inflamatórios.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Benjamín Rodríguez, Marisa Nicolai e "Fundação para a Ciência e a Tecnologia" (bolsa de doutoramento nº SFRH/BD/19250/2004, P.R.).

Conflito de Interesses

Os autores declaram não existir qualquer relação pessoal ou financeira que possa ser entendida como representando um potencial conflito de interesses.

References / Referências

- [1] Eldeen IMS, Van Staden J. Cyclooxygenase inhibition and antimycobacterial effects of extracts from Sudanese medicinal plants. *South African J Botany* 2008; 74: 225–9.
- [2] Rijo P, Simões MF, Rodríguez B. Spectral Assignments and Reference Data Structural and spectral assignment of three forskolin-like diterpenoids isolated from *Plectranthus ornatus*, *Magn Reson Chem* 2005; 43: 595–8.
- [3] Rijo P, Rodríguez B, Duarte A, Simões MF. Antimicrobial properties of *Plectranthus ornatus* extracts, 11-acetoxylalima-5,13-dien-15-oic acid metabolite and its derivatives. *Nat Prod J* 2011; 1:57-64.
- [4] Rijo P, Simões MF, Francisco AP, Rojas R, Gilman RH, Vaisberg AJ, Rodríguez B, Moiteiro C. Antimycobacterial metabolites from *Plectranthus*: royleanone derivatives against *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Chem Biodiv* 2010; 7:922-32.
- [5] Oliveira P, Ferreira AA, Silveira D, Alves RB, Rodrigues GV, Emerenciano VP, Raslan DS. *J Nat Prod* 2005; 68:588-91.
- [6] Rijo P, Gaspar-Marques C, Simões MF, Duarte A, Apreda-Rojas MC, Cano FH, Rodríguez B. Neoclerodane and labdane diterpenoids from *Plectranthus ornatus*, *J Nat Prod* 2002; 65:1387-90.
- [7] Rijo P, Gaspar-Marques C, Simões MF, Jimeno ML, Rodríguez B. Further diterpenoids from *Plectranthus ornatus* and *P. grandidentatus*. *Biochem System Ecol* 2007; 35:215-21.
- [8] Smith CJ, Zhang Y, Koboldt Cm, Jerry Muhammad, Ben S. Zweifel, Alex Shaffer, John J. Talley, Jaime L. Masferrer, Karen Seibert, and Peter C. Isakson; Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13313-8.
- [9] Cao H, Yu R, Choi Y, Ma Z-Z, Zhang H, Xiang W, Lee DY-W, Berman BM, Moudgil KD, Fong HHS, van Breemen RB. Discovery of cyclooxygenase inhibitors from medicinal plants used to treat inflammation. *Pharmacol Res* 2010; 61: 519-24.
- [10] Kulmacz RJ, Lands WEM. Requirements for hydroperoxide by the cyclooxygenase and peroxidase activities of prostaglandin H synthase. *Prostaglandins* 1983; 25:531-40.
- [11] Pisoschi AM, Cheregi MC, Danet AF. Total Antioxidant Capacity of Some Commercial Fruit Juices: Electrochemical and Spectrophotometrical Approaches, *Molecules* 2009; 14:480-93.
- [12] Rijo P. Phytochemical study and biological activities of diterpenes and derivatives from *Plectranthus* species. PhD thesis. Universidade de Lisboa, 2010.
- [13] Hegazy M-EF, Ohta S, Abdel-latif FF, Albadry HA, Ohta E, Pare PW, Hirata T. Cyclooxygenase (COX)-1 and -2 inhibitory labdane diterpenes from *Crassocephalum mannii*. *J Nat Prod* 2008; 71:1070–3.
- [14] DeWitt DL. Cox-2-Selective Inhibitors: The New Super Aspirins. *Mol Pharmacol* 1996; 55:625–31.
- [15] Perez RMG. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from plants. *The Scientific World* 2001; 1: 713-84.
- [16] Van Jaarsveld E., *The Southern African Plectranthus and the art of turning shade to glade*, 1st Edition, Fernwood press, South Africa, 2006.