



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Departamento de Farmácia



**Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas**

RAQUEL GARCIA ISOLANI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EXTRATOS E DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE
Limonium brasiliense CONTRA HERPES SIMPLEX TIPO I**

MARINGÁ

2017

RAQUEL GARCIA ISOLANI

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EXTRATOS E DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE
Limonium brasiliense CONTRA HERPES SIMPLEX TIPO I**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

MARINGÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

I85a Isolani, Raquel Garcia
Avaliação antiviral de extratos e substâncias isoladas de *Limonium brasiliense* contra Herpes Simplex Tipo I. / Raquel Garcia Isolani. -- Maringá, 2019.
54 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador(a): Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, 2019.

1. *Limonium brasiliense*. 2. Taninos. 3. Fitoquímica. 4. Antiviral. 5. Herpes simplex virus. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos.. III. Título.

CDD 21.ed. 615.321

AHS-CRB-9/1065

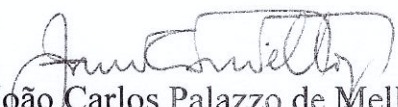
RAQUEL GARCIA ISOLANI

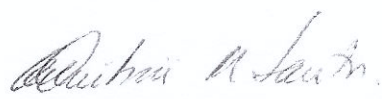
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE EXTRATOS E DAS SUBSTÂNCIAS
ISOLADAS DE *LIMONIUM BRASILIENSE* CONTRA
HERPES SIMPLEX TIPO I**

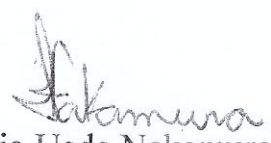
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 31 de janeiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA


João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Cid Aimbiré de Moraes Santos
Universidade Federal do Paraná


Tânia Ueda Nakamura
Universidade Estadual de Maringá

A primeira etapa deste trabalho, isolamento dos compostos presentes na fração acetato de etila de *Limonium brasiliense*, foi realizada no Laboratório de Biologia Farmacêutica – Palafito, na Universidade Estadual de Maringá, bloco k80, sala 14. As análises de massas foram realizadas utilizando equipamentos do Laboratório de Bioequivalência, Hospital Universitário de Maringá (Profa Dra Elza Kimura) e as análises de RMN foram realizadas no Laboratório de RMN, Universidade Estadual de Maringá, bloco 31, salas 11 e 12. Os ensaios de atividade antiviral foram realizados no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, na Universidade Estadual de Maringá, bloco b08.

Partes desse trabalho foram apresentadas nos seguintes eventos:

Raquel Garcia Isolani, Thalita Zago de Oliveira, Daniela Cristina de Medeiros, Tânia Ueda Nakamura, João Carlos Palazzo de Mello. *Limonium brasiliense*: a citotoxic evaluation in vero cells. In: VIII Seminário Annual do PCF, Maringá, PR – 22-24 de Novembro de 2017.

Raquel Garcia Isolani, Thalita Zago de Oliveira, Daniela Cristina de Medeiros, Tânia Ueda Nakamura, João Carlos Palazzo de Mello. *Limonium brasiliense*: structural analysis and evaluation of cytotoxicity in vero cells for treatment of human herpes simplex. In: VIII Seminário Annual do PCF, Maringá, PR – 22-24 de Novembro de 2017.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha filha Maria Eduarda.

AGRADECIMENTOS

À minha filha, Maria Eduarda Isolani, por me dar incentivo e força para seguir meus sonhos. Se alcancei mais uma etapa da minha vida, devo a ela.

Aos meus pais, Rosélio e Fátima, ao meu irmão Gabriel e meus avós, Jaira e Carlos pelo apoio, amor e ajuda incondicional. Por estarem dispostos a estar com minha filha nos momentos em que eu precisei estar ausente e a cuidarem dela com o mesmo amor que eu.

Ao meu namorado Murilo Luvizotto Vieira, que está do meu lado desde o cursinho pré-vestibular, sempre me impulsionando e me acalmando com suas palavras de incentivo e amor.

Ao professor João Carlos Palazzo de Mello, pela orientação, ensinamentos, auxílio e o mais importante: amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de realização deste trabalho, em especial à Helena, por ser tão querida e disposta a ajudar.

À professora Tânia Ueda Nakamura, que contribuiu para o desenvolvimento deste trabalho, juntamente com a mestrande Thalita Zago, que me salvou inúmeras vezes e se tornou uma colega de trabalho muito especial.

Ao técnico Admir pela ajuda, paciência e pelas vezes que me socorreu com os equipamentos.

Aos colegas do laboratório PALAFITO, pela amizade, apoio e ajuda sempre que necessário em especial à Mariana Nascimento de Paula e Taisa Rörig Ribeiro, por dividir cada etapa do mestrado; à Dra Andressa Blainski, pelos conhecimentos transmitidos e contribuição neste trabalho e à Dra Daniela Medeiros por todo o suporte e amizade.

Às minhas melhores amigas, que dividiram todos os momentos comigo desde a graduação: Fernanda Pilatti, Kariman Inácio, Larissa Valone e, a já citada, Mariana Nascimento de Paula. A essas não tenho nem palavras para agradecer por tanta coisa boa que fazem por mim.

Aos amigos da faculdade Isabela, Dionatan, Gabriela, Isadora, Lívia, Raizza, Simone, Fernanda Gaburo, Larissa Godinho e Taisa, pelo apoio, amizade, compreensão e companheirismo em todos os momentos (os sérios e as festas).

Às amigas do Colégio Regina Mundi, que também seguem comigo até hoje: Amanda, Bruna e Nicolly, pela amizade verdadeira de muitos anos.

Aos demais docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, por todo o conhecimento que eu adquiri.

Aos membros da banca de qualificação, que participaram da discussão deste trabalho: Dra. Andressa Blainski e Profa. Dra. Lígia Faccin Galhardi. Assim como os membros da banca de defesa: Prof. Dr. Cid Aimbiré e Profa. Dra. Tânia Ueda Nakamura.

Ao CNPq, CAPES, INCT_if, FINEP e Fundação Araucária, pelo suporte financeiro.

Ao incentivo financeiro para a realização dessa pesquisa que se deu por meio da bolsa fornecida pela CAPES.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Nenhum problema pode ser resolvido a partir
do mesmo nível de consciência que o criou.”
(Albert Einstein)

BIOGRAFIA



Raquel Garcia Isolani nasceu em Maringá, PR, no dia 03 de julho de 1992, filha de Rosélio Cesar Isolani e Fátima Garcia Isolani. Em 2009 concluiu o ensino médio no Colégio Regina Mundi, em Maringá. Em 2011 ingressou no curso de Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá e nesse período participou de Projetos de Iniciação Científica no laboratório de Biologia Farmacêutica, Palafito, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Realizou estágio em Farmácia de Manipulação, formando-se em 2015. Desde 2016 realiza mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

RESUMO

ISOLANI, R. G. 2017. Avaliação da atividade de extratos e substâncias isoladas de *Limonium brasiliense* contra Herpes Simplex tipo I. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 59 p.

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae), popularmente conhecida como baicuru, é uma planta nativa da região sul do Brasil. Seu uso popular se dá por meio de decocto ou infuso dos rizomas, que são usados para o tratamento de tensão pré-menstrual, distúrbios menstruais e infecções do trato geniturinário. Sabe-se da existência de substâncias fenólicas no gênero *Limonium*, como se sabe também de atividades biológicas deste gênero, relacionando então com as substâncias presentes. O Herpes simplex vírus tipo-1 (HSV-1) causa infecções orofaciais e oculares, podendo permanecer latente no organismo. O aciclovir é a droga de escolha para tratamento do HSV-1, porém já existem algumas cepas resistentes ao medicamento. Por meio de métodos de isolamento cromatográfico e análise estrutural, foram obtidas moléculas epigallocatequina-3-O-galato (EGCG), samarangenina A (SA) e samarangenina B (SB). O extrato bruto (EB), fração aquosa (FAQ), fração acetato (FAE), uma subfração da FAE (FLB7) e as substâncias isoladas de *L. brasiliense* foram testadas para avaliar a citotoxicidade frente a células Vero, pela metodologia de MTT. Os valores de CC_{50} foram de: EB= 85 ± 5 , FAQ= $56,67 \pm 11,55$, FAE= $41,67 \pm 12,58$, FLB7= $43,33 \pm 5,77$, EGCG= $66,67 \pm 15,28$, SA= 33 ± 7 e SB= $45 \pm 5,77$ $\mu\text{g/mL}$ e os valores de EC_{50} encontrados foram de: EB= $9,33 \pm 0,70$, FAQ> 50, FAE= $2,50 \pm 0,17$, FLB7= $2,47 \pm 0,25$, EGCG= $4,97 \pm 4,36$, SA= $4,03 \pm 0,21$ e SB= $3,20 \pm 1,04$ $\mu\text{g/mL}$. Assim, foi possível elucidar as substâncias majoritárias presentes na espécie *L. brasiliense* e a determinação da atividade antiviral de cada uma delas.

Palavras chave: *Limonium brasiliense*, taninos, fitoquímica, antiviral, Herpes simplex virus.

ABSTRACT

ISOLANI, R.G. 2017. Activity evaluation of extracts and isolated compounds of *Limonium brasiliense* against Herpes Simplex type I. Master's Dissertation, Post-Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringá. 59 p.

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae), popularly known as baicuru, is a plant native to southern Brazil. Its popular use is through decoction or infusion of the rhizomes, which are used for the treatment of premenstrual tension, menstrual disorders and genitourinary tract infections. It is known the existence of phenolic compounds in the genus *Limonium*, as it is also known the biological activities of this genus, thus relating to the substances present. The Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) causes orofacial and ocular infections, and may remain latent in the body. Acyclovir is the drug of choice for HSV-1 treatment, but there are already some drug-resistant strains. By methods of chromatographic isolation and structural analysis, molecules of epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG), samarangenin A (SA) and samarangenin B (SB) were obtained. The crude extract (CE), water fraction (WF), ethyl acetate fraction (EAF), EAF subfraction (FLB7) and substances isolated from *L. brasiliense* were tested to evaluate cytotoxicity against Vero cells, by MTT assay. The results were CC₅₀ values of: CE = 85 ± 5, WF = 56,67 ± 11,55, EAF = 41,67 ± 12,58, FLB7 = 43,33 ± 5,77, EGCG = 66,67 ± 15,28, SA = 33 ± 7 and SB = 45 ± 5,77 µg/mL and the EC₅₀ values were: CE = 9,33 ± 0,70, WF > 50, EAF = 2,50 ± 0,17, FLB7 = 2,47 ± 0,25, EGCG = 4,97 ± 4,36, SA = 4,03 ± 0,21 and SB = 3,20 ± 1,04 µg/mL. It was possible to elucidate the major substances present in the *L. brasiliense* species and to determine the antiviral activity of each of them.

Key words: *Limonium brasiliense*, tannins, phytochemistry, antiviral, Herpes simplex virus.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Família Plumbaginaceae	15
2.2 Gênero <i>Limonium</i>	15
2.3 Espécie <i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze	20
2.4 Herpes simplex vírus tipo 1	23
3 OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Droga vegetal	28
4.2 Preparo de extrato bruto e fração acetato de etila	28
4.2.1 Extrato bruto dos rizomas de <i>Limonium brasiliense</i>	28
4.2.2 Partição líquido-líquido a partir do EB	28
4.3 Isolamento.....	29
4.3.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila.....	29
4.3.2 Análise das subfrações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	29
4.3.2.2 Equipamento e condições cromatográficas para análise por CLAE	29
4.3.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)	30
4.4 Análise estrutural.....	30
4.4.1 Espectrometria de massas.....	30
4.4.2 Derivatização química.....	30
4.4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	30
4.5 Atividade biológica	31
4.5.1 Ensaios de citotoxicidade em cultura de células	31

4.5.2 Ensaio de atividade antiviral contra Herpes simplex vírus tipo I	31
4.5.3 Leitura das placas (teste de MTT).....	31
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6.1 Isolamento.....	33
6.1.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração semipurificada acetato de etila	33
6.1.2 Análise das subfrações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	33
6.2 Análise estrutural.....	33
6.3 Atividade biológica	42
6.3.1 Ensaios de citotoxicidade em cultura de células	42
6.3.2 Ensaio de atividade antiviral contra Herpes simplex vírus tipo I	44
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Limonium brasiliense</i> , (A) partes aéreas e rizomas, (B) exsicata das partes aéreas e (C) exsicata dos rizomas. Foto: Andressa Blainski (2010).	12
Figura 2 - Diagrama do vírion HSV-1.	24
Figura 3 - Cromatograma da subfração 10 obtida da FAE de <i>L. brasiliense</i> por meio de coluna contendo Sephadex LH20. Substância: epigalocatequina-3-O-galato.	34
Figura 4 - Espectro de massas da epigalocatequina-3-O-galato.	34
Figura 5 - Espectro de RMN de ^1H da epigalocatequina-3-O-galato acetilada.	35
Figura 6 - Cromatograma da subfração 19 obtida da FAE de <i>L. brasiliense</i> por meio de coluna de Sephadex LH20. Substância: samarangenina A.	37
Figura 7 - Espectro de massas da samarangenina A.	37
Figura 8 - Espectro de RMN de ^1H da samarangenina A acetilada.	38
Figura 9 - Cromatograma da subfração 19 obtida da FAE de <i>L. brasiliense</i> por meio de coluna contendo Sephadex LH20. Substância: samarangenina B.	40
Figura 10 - Espectro de massas da samarangenina B.	40
Figura 11 - Espectro de RMN de ^1H da samarangenina B acetilada.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados da substância epigallocatequina-3-O-galato (300 MHz, ^1H , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).....	35
Tabela 2 - Dados da substância samarangenina A (300 MHz, ^1H , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).....	38
Tabela 3 - Dados da substância acetilada samarangenina B (300 MHz, ^1H , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).	41
Tabela 4 - Citotoxicidade de extrato, frações e isolados de <i>Limonium brasiliense</i> em células Vero.....	43
Tabela 5 - Ensaio anti HSV-1 (KOS) de extrato, frações e isolados de <i>Limonium brasiliense</i> em células Vero.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC: Coluna cromatográfica

CC₅₀: Cytotoxic concentration 50% (concentração citotóxica 50%)

CCD: Cromatografia em camada delgada

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

DMSO: Dimetilsulfóxido

EB: Extrato bruto

EC₅₀: Effect concentration 50% (concentração efeito 50%)

ECA: Enzima conversora da angiotensina

FAE: Fração acetato de etila

FAQ: Fração aquosa

HSV-1: Herpes Simples vírus tipo 1

HSV-2: Herpes Simples vírus tipo 2

I.p.: Intra-peritonal

IC₅₀: Inhibitory concentration 50% (concentração inibitória 50%)

IS: Índice de seletividade

kV: Quilovolt

MIC: Minimum inhibitory concentration (concentração inibitória mínima)

NO: Óxido nítrico

PBS: Phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

TMS: Tetrametilsilano

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um país com uma grande biodiversidade, com uma biota estimada entre 170 e 210 mil espécies, correspondendo a cerca de 13% da riqueza mundial. As plantas estão entre os grupos mais bem estudados no Brasil e reconhece-se a ocorrência de 34.916 espécies (Simões *et al.*, 2016).

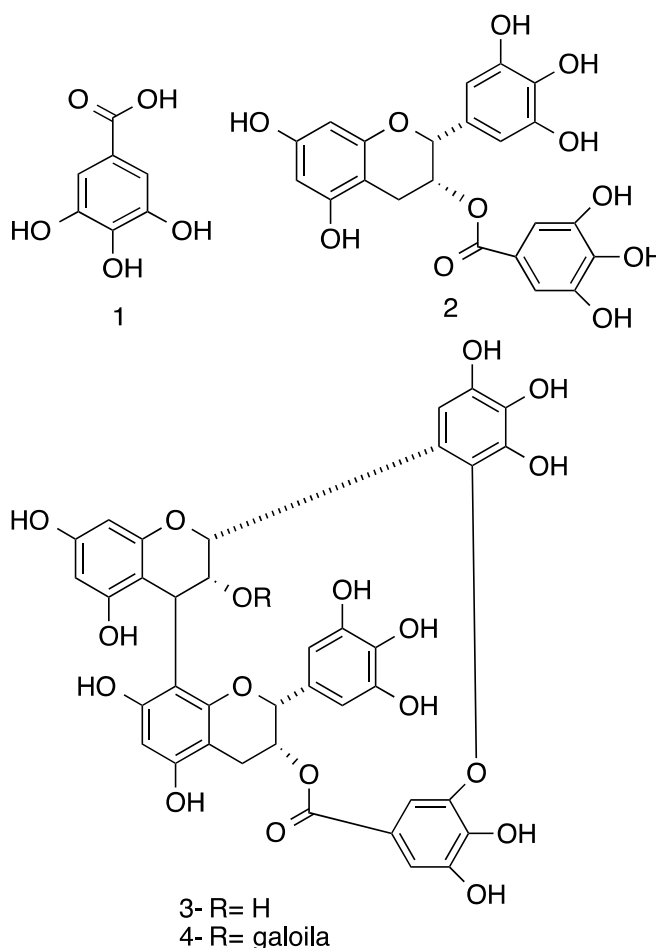
Entre as plantas estudadas encontra-se a espécie vegetal *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (figura 1), que é conhecida popularmente como baicuru ou guaicuru e pertence à família Plumbaginaceae. É uma planta encontrada na América do Sul e vegeta no litoral, preferencialmente em terrenos baixos e banhados com água salgada (Correa e Penna, 1974).



Figura 1 - *Limonium brasiliense*, (A) partes aéreas e rizomas, (B) exsicata das partes aéreas e (C) exsicata dos rizomas. Foto: Andressa Blainski (2010).

O farmacógeno do *L. brasiliense* é seus rizomas, que são empregados popularmente na forma de decocto ou infuso como antisséptico nas infecções geniturinárias e possui também a propriedade de ser adstringente. Tem como outras indicações seu uso como diurético, no tratamento do reumatismo, artrite, úlceras, na hemorragia intestinal e diarreia crônica (Moura *et al.*, 1985; Cardoso, 1990). Seus extratos são ainda recomendados para normalizar os períodos menstruais em mulheres com atraso ou irregularidades na menstruação (Lifchitz, 1981).

Foi relatada nos extratos dos rizomas de *L. brasiliense* a presença de taninos condensados, como ácido gálico, epigallocatequina-3-O-galato, samarangenina A e samarangenina B (estrutura química 1) (Murray *et al.*, 2004; De Oliveira Caleare *et al.*, 2017).



Estrutura química 1 - Estrutura molecular dos compostos identificados de *L. brasiliense*. (1) ácido gálico, (2) epigallocatequina-3-O-galato, (3) samarangenina A e (4) samarangenina B.

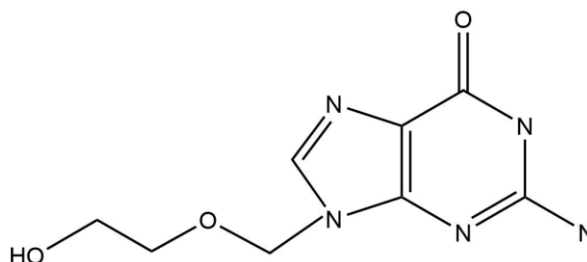
Análises de taninos condensados são complicadas devido à diversidade de estruturas encontradas nesse grupo de substâncias (Schofield *et al.*, 2001). Os taninos condensados são polímeros de unidades de flavonóis e a presença de ésteres de galato pode alterar suas propriedades biológicas significativamente (Hagerman e Butler, 1989).

Sabe-se que o impacto da atividade antimicrobiana depende da configuração estrutural da molécula (Gyawali e Ibrahim, 2014) e os compostos fenólicos possuem variações estruturais e o que confere aos taninos suas propriedades características são os grupos hidroxila fenólicas (Haslam, 1974). Esses grupos possuem ação inibitória (Lai e Roy, 2004) devido à interação com a membrana celular bacteriana, rompendo a membrana e causando extravasamento de componentes celulares (Xue *et al.*, 2013). Além disso, podem facilmente se ligar ao sítio ativo de enzimas, alterando o metabolismo celular de

microorganismos. Estas ações demonstram a importância dos grupos -OH na atividade antimicrobiana (Frag et al., 1989).

A infecção humana por Herpes simplex vírus é uma das causas mais frequentes de infecções virais em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos. A infecção se dá comumente por uma infecção primária e depois por longos períodos de latência, seguida por reativação intermitente, geralmente durante períodos de imunossupressão (Villarreal, 2003). É um vírus incurável que persiste por toda a vida do hospedeiro (Hassan et al., 2015).

O tratamento da infecção por Herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) é um grande alvo de estudos no mundo todo, visto que não existe vacina para essa doença. Um dos tratamentos aprovados e mais comum é o uso do Aciclovir (estrutura química 2), um análogo de guanosina que inibe seletivamente a atividade da DNA polimerase viral (Villarreal, 2003). Entretanto, o uso intenso dessa droga causou o aparecimento de cepas resistentes a ela (Kopp et al., 2014). A busca por novas drogas antiherpéticas é um desafio aos pesquisadores e os produtos naturais são ricos em substâncias bioativas que possuem atividade antiviral (Sagar et al., 2010).



Estrutura química 2 - Estrutura molecular do Aciclovir.

Plantas são comumente usadas para o tratamento de várias doenças virais. Nas últimas décadas, compostos naturais estão sendo investigados para suas propriedades anti-HSV (Kurokawa et al., 1999; Lipipun et al., 2003; Gescher et al., 2011; Ueda et al., 2013; Nocchi et al., 2016; Lavoie et al., 2017). A purificação e identificação dos compostos bioativos é muito importante para o desenvolvimento de novas drogas.

Portanto, esse trabalho visou otimizar métodos de isolamento por meio de diferentes métodos cromatográficos, elucidar a composição química por meio de técnicas espectrométricas da fração acetato de etila de *L. brasiliense*, e posteriormente testar a atividade citotóxica e antiviral das substâncias isoladas, frações e extrato bruto.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Plumbaginaceae

A família Plumbaginaceae Juss. é a maior família pertencente às Angiospermas e possui 24 gêneros, com cerca de 2340 espécies, sendo 635 nomes aceitos e 630 sinônimos, os demais não são avaliados (The Plant List, 2013). Essas espécies vegetam regiões semi-áridas, litorâneas e salgadas (Simões *et al.*, 2016).

No Brasil existem dois gêneros pertencentes a essa família, *Plumbago* L. e *Limonium* Mill., porém apenas duas espécies os representam, *Plumbago scandens* L. e *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Zappi, 2015).

A família Plumbaginaceae representa ervas perenes e arbustos, com suas plantas caracterizadas por folhas simples e alternas, sem estípulas. As flores são vistosas, azuis, bissexuais e possuem simetria radial (Joly, 2005; W. John Kress, 2008).

2.2 Gênero *Limonium*

O gênero *Limonium* pertence à família Plumbaginaceae e possui cerca de 777 espécies, com 163 destas aceitas e 113 sinônimos, as demais não são avaliadas (Kunitake *et al.*, 1995; List, 2013a).

As plantas pertencentes ao gênero *Limonium* são usadas por floriculturas no preparo de arranjos, usando suas flores frescas ou desidratadas (Kunitake *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 2003).

Este gênero possui riquíssima composição química, com aminoácidos, taninos, alcaloides, flavonoides, polissacarídeos, entre outros (Eren e Özata, 2014).

Estudos com espécies do gênero *Limonium* comprovam a presença de flavonóides, entre eles miricetina e seus derivados, quercetina e seus derivados, naringenina, homoeriodictiol, eriodictiol e canferol (Ross, 1984; Zhang e Zou, 2004; Movsumov e Garaev, 2005; Ye e Huang, 2006).

Nas espécies *L. gmelinii* (Willd.) Kuntze e *L. popovii* Kubansk foram isolados e identificados ácido gálico, quercetina, miricetina, miricetrina, epigallocatequina-3-O-galato, 3-O-β-D-(6"-galoila)-galactopiranosídeo, miricetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo, 3-O-β-D-glucopiranosídeo, 3-O-β-D-(6"-galoila)-glucopiranosídeo, 3,5,7,3',4',6'-hexahidroxiflavona e miricetina 3-O-α-L-(2'-galoila)-arabopiranosídeo (Korul'kina *et al.*, 2004).

A partir do extrato hidroetanólico de *L. gmelinii* foram isolados e identificados duas proantocianidinas diméricas (2*R*,3*R*,4*R*-epigallocatequina-(4β-8)-2*R*,3*R*-epigallocatequina-3-

O-galato e 2*R*,3*R*,4*R*-epigallocatequina-(4 β -8)-2*R*,3*R*,3,5,7,3',4',6'-hexahidroxiflavana), galocatequina e epigallocatequina (Zhusupova e Abil'kaeva, 2006a; b).

As espécies *L. gmelinii*, *L. otolepis* (Scherenk) Kuntze, *L. popovii* Kubansk, *L. myrianthum* (Schrenk) Kuntze, *L. leptophyllum* Kuntze e *L. suffruticosum* (L.) Kuntze (pertencentes à região do Cazaquistão) foram estudadas quanto à composição de ácidos graxos. Constatou-se que há apenas diferenças quantitativas na presença de ácidos graxos insaturados e saturados entre as espécies, pois a avaliação qualitativa foi a mesma. Além disso, pôde-se perceber que a concentração de ácido graxo insaturado foi de duas a quatro vezes maior que de saturado nas partes aéreas das plantas (Zhusupova e Abil'kaeva, 2006a; b).

Amostras de sementes de 17 espécies de *Limonium* foram avaliadas e constatou-se a presença de fitoecdisteroides, que são substâncias análogas ao estrógeno, em 7 espécies: *L. bellidifolium* Dumont., *L. binervosum* Salmon, *L. gerberi* Soldano, *L. otolepis* (Scherenk) Kuntze, *L. peregrinum* R.A. Dryer, *L. perezii* (Stapf) F.T. Hubb. e *L. ramosissimum* (Poir) Maire. (Whiting et al., 1998).

Limoniastrum guyonianum Durieuex Boiss foi estudada e demonstrou a presença de polifenóis, flavonoides e taninos condensados em suas folhas e galhos (Trabelsi et al., 2012). Dois monômeros (N-*E*-cafeoil tiramina e N-*E*-feruloil tiramina) e um dímero (Limoniastramida) de amida fenólica ácida foram isolados dessa espécie (Trabelsi et al., 2014).

Foram isolados de *L. thouinii* (viv.) Kuntze quercetina, vitexina (apigenina 8-C-glucosídeo), isoorientina (luteolina 6-C-glucosídeo) e canabiscitrina (miricetina-3'-O-glucosídeo). Esses quatro flavonoides foram identificados pela primeira vez nesta espécie, sendo o canabiscitrina inédito na família Plumbaginaceae (Lefahal et al., 2016).

As flores de *L. aureum* (L.) Hill foram submetidas à extração com etanol e partição com acetato de etila. Após os processos de separação, foram isolados eriodictiol, luteolina, apigenina, 5,7-dihidroxicromona, quercetina-3-O- β -D-xilosídeo e miricetina-3-O- β -D-xilopiranosídeo (Liu et al., 2016).

O extrato das raízes de *L. sinense* apresentou efeito hepatoprotetor, com bloqueio do aumento da atividade sérica da aspartato aminotransferase e da alanina aminotransferase (Tang et al., 2007).

Em um estudo *in vitro* do extrato etanólico das partes subterrâneas de *L. sinense* e da substância isolada ácido gálico, ambos apresentaram potente atividade de supressão de infecção hepática causada pelo vírus da hepatite C, bloqueando a entrada do vírus na célula (Hsu et al., 2015).

De acordo com Kim e colaboradores (2016), a fração acetato de etila de *L. tetragonum* é capaz de atenuar a injúria hepática e fibrose em ratos tratados com dietilnitrosamina, um composto tóxico que causa necrose e fibrose no fígado. A administração de 200 mg/kg da fração de *L. tetragonum* durante 8 semanas foi capaz de reduzir significativamente as enzimas ALT (Alanina transaminase), AST (Aspartato aminotransferase), ALP (Fosfato alcalino), GGT (Gammaglutamiltransferase) e triacilglicerídeos nos ratos. O estresse oxidativo no fígado também foi reduzido após tratamento (Kim *et al.*, 2016).

Segundo Kurul'kina *et al.* (2004) e Zhusupova e Abil'kaeva (2006b), o *L. gmelinii* (Willd.) Kuntze é usado na medicina popular, na república do Cazaquistão, como adstringente, em doenças gastrintestinais e do trato respiratório superior.

Estudos com o extrato etanólico do *L. sinense* (Girard) Kuntze demonstraram sua efetividade contra o vírus HSV-1. Pelo fracionamento bioguiado isolou-se a samarangenina B, que pelos ensaios mostrou ser um agente antiviral contra a replicação do vírus e, aparentemente, sem citotoxicidade *in vitro*, mostrando que na concentração de 100 µM a viabilidade celular foi mantida em aproximadamente 80% durante 5 dias (Kuo *et al.*, 2002). Em outro estudo, diferentes extratos (etanólico, metanólico, hexânico e diclorometano) de *L. densiflorum* (Guss.) Kuntze foram testados quanto à atividade antiviral frente ao HSV-1 e vírus influenza (H1N1), obtendo-se melhor resultado com o extrato etanólico contra vírus HSV-1, o qual exibiu potente ação inibitória. Esses extratos foram analisados por CCD (cromatografia em camada delgada), demonstrando a presença de flavonoides e saponinas como a classe de produtos majoritários (Medini, Legault, *et al.*, 2014).

Através de outro estudo de fracionamento bioguiado, foram isolados do extrato hidroetanólico de *L. densiflorum*: ácido gálico, epigallocatequina galato, uma mistura de miricetina-3-O-L-arabinofuranosídeo e miricetina-3-O-R-L-ramnopiranosídeo, quercetina-3-O-L-ramnosídeo, diidrocanferol, pinoresinol e *trans-N*-feruloil tiramina, os quais foram avaliados para a capacidade de inibir *in vitro* infecções causadas por HSV-1. Todas as moléculas testadas não apresentaram toxicidade em células Vero na concentração de até 50 µg/mL. O ácido gálico e epigallocatequina galato apresentaram uma forte atividade antiviral, com índice virucida de 100%. Pinoresinol e *trans-N*-feruloil tiramina apresentaram atividade moderada, com capacidade antiviral de 26%, enquanto os demais compostos não apresentaram atividade contra HSV-1 (Medini *et al.*, 2016).

A espécie *L. bicolor* (Bunge) Kuntze, é utilizada popularmente como homeostático, na cura de desordens menstruais e no tratamento de carcinomas uterinos (Zhang e Zou, 2004).

Testes de atividade antitumoral e imunomodulatória de polissacarídeos de raízes de *L. sinense* mostraram a inibição do crescimento de tumores em ratos e efeito sinérgico significativo da atividade antitumor quando combinado com 5-fluorouracil (5-FU) (Tang *et al.*, 2012).

Ensaio de atividade mutagênica e citotóxica de extratos das raízes e folhas de *L. globuriferum* foram realizados pelos métodos de Ames e MTT, em células MDBK. Nos testes de mutagenicidade, apenas o extrato metanólico das folhas apresentou atividade mutagênica na concentração de 10.000 µg/mL. Os testes de MTT mostraram que os extratos reduziram a viabilidade celular, com exceção do extrato das folhas produzido com acetona/metanol (2:1) que aumentou a viabilidade (Eren e Özata, 2014).

O extrato aquoso de *L. wrightii* (Hance) Kuntze demonstrou forte ação antirradicais livres *in vitro* pelos métodos de 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) e ânion superóxido e moderada ação para radicais hidroxilas. A administração intraperitoneal desse extrato em ratos com intoxicação hepática induzida por tetracloreto de carbono demonstrou a redução da atividade sérica de aspartato aminotransferase e da alanina aminotransferase, característico de atividade antirradicais livres *in vivo*. Pode-se relacionar essa ação com a presença de ácido gálico no extrato (Aniya *et al.*, 2002).

Testes de atividade antioxidante de *L. duriusculum*, mostraram que o extrato *n*-butanólico possui ação antirradicais livres pelos métodos de DPPH, LPO (lipoperoxidação) e capacidade de quelar ferro. Além disso, foram isolados apigenina, metil galato 4-metil éter, ácido 4-*O*-metilgálico, metil galato, ácido vanílico, pinoresinol, apigenina-7-*O*-β-(6"-metilglucoronídeo), β-sitosterol e duas substâncias novas, nomeadas de duriculina A e duriculina B (Kerkatou *et al.*, 2016).

Estudos com o extrato *n*-butanólico de *L. bonduelli* demonstraram efeito antilipidioperoxidativo, podendo ser útil na prevenção do avanço de várias doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como as neurodegenerativas. Essa ação se dá pelos compostos fenólicos com ação antioxidante presentes na planta (Amrani *et al.*, 2017).

A espécie *L. aureum* (L.) Hill foi utilizada para a pesquisa de compostos com atividade antioxidante por meio de um método otimizado online-CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) com DPPH, para detecção da capacidade de eliminação de radicais livres. Foram identificados sete flavonoides incluindo miricetina-3-*O*-β-D-(6"-*O*-galoil)-glucopiranosídeo, miricetina-3-*O*-glucosídeo, miricitrina, eriodictiol-7-*O*-glucosídeos, miricetina, eridictiol e homoeridictiol (Geng *et al.*, 2015).

A atividade antioxidante de dez extratos de *L. delicatulum* (Girard) Kuntze em diferentes estágios fisiológicos (5 extratos para estágio de floração e 5 extratos para estágio

vegetativo), foi avaliada frente ao radical DPPH. Os extratos do estágio de floração (acetona, metanol e etanol) apresentaram maior atividade antioxidante quando comparados aos extratos aquosos e hexânicos. Estes também apresentaram melhor atividade antimicrobiana contra sete bactérias patogênicas em humanos Gram positivas e Gram negativas. Nesses extratos foram identificados por CLAE alguns compostos fenólicos, sendo os principais o ácido *p*-cumárico e ácido clorogênico, os quais foram associados ao melhor desempenho desses extratos (Medini, Fellah, *et al.*, 2014).

Um estudo comparativo das atividades anti-inflamatória e antioxidante de *L. algarvense* Erben e *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (chá verde) mostrou que *L. algarvense* possui maior atividade antioxidante, principalmente sobre o radical superóxido, quando comparado ao chá verde, possuindo também maior atividade anti-inflamatória em testes *in vitro*, inibindo a produção de óxido nítrico com amostras de infusão e decocção, com valores de IC₅₀ de 46,3 e 48,5 µg/mL, respectivamente (Rodrigues *et al.*, 2016).

Estudos estatísticos otimizaram a extração de antioxidantes por meio de ultrassom das flores de *L. sinuatum* (L.) Mill., usando um *design* de superfície de resposta. Quatro fatores de extração foram avaliados: concentração de etanol, proporção entre droga vegetal e solvente, tempo de ultrassom e temperatura. A atividade antioxidante ótima (483,01 ± 15,39 µmol Trolox/g Droga Seca) foi obtida com etanol 60%, proporção droga vegetal:solvente 56,9:1 mL/g, temperatura de 40 °C e tempo de ultrassom de 9,8 min (Xu *et al.*, 2017).

Por meio dos métodos de capacidade de absorvância do radical oxigênio (método ORAC), atividade de eliminação do ânion superóxido e atividade em células, Medini *et al.* (2015) testaram extratos hexânico, diclorometano, metanólico e etanólico de *L. densiflorum* (Guss.) Kuntze para a atividade antioxidante. A atividade anti-inflamatória foi avaliada por quantificação do óxido nítrico (NO). Em ambos os testes, o extrato metanólico exibiu melhores resultados. No entanto, o extrato diclorometano apresentou a maior atividade anticancerígena contra carcinoma pulmonar humano e adenocarcinoma de cólon.

Em um estudo realizado para avaliar o efeito inibitório dos extratos de *L. michelsonii* Lincz. sobre a ECA (enzima conversora de angiotensina), foi relatado que a planta é rica em compostos capazes de inibir essa enzima. Vinte compostos fenólicos foram isolados e a maioria deles mostrou significativa atividade inibitória à ECA (IC₅₀ = 7,1 – 138,4 µM). Curiosamente, os compostos glicosilados apresentaram melhor inibição que suas respectivas agliconas. Em um estudo cinético, pôde-se determinar que os flavonoides e diidroflavonoides apresentaram o tipo de inibição competitiva da ECA. Além disso, dos vinte compostos isolados, dois são inéditos no gênero *Limonium*, sendo eles apigenina-7-O-β-D-

glucopiranosídeo e apigenina-7-O- β -D-(6"-metilglucoronídeo). Esses compostos podem ser usados para distinguir *L. michelsonii* de outras espécies de *Limonium* (Jenis *et al.*, 2017).

A espécie *L. tetragonum* possui capacidade de inibir metaloproteínases em fibrossarcomas humanos HT1080. Os testes foram feitos por meio de determinação da atividade de metaloproteínases por gelatina zimografia, seguido por RT-PCR (isolamento de RNA e transcrição reversa – reação de cadeia polimerase) e análises de Western blot (Bae *et al.*, 2016).

L. tetragonum possui metabólitos ativos com potencial efeito antiadipogênico. Testes de citotoxicidade revelaram que os extratos não são tóxicos em células estromáticas D1, assim como os ensaios de expressão de mRNA e proteínas cruciais na adipogênese mostraram que as frações *n*-butanólica e *n*-hexânica foram ativas na redução nos níveis de expressão de mRNA. Os metabólitos presentes nas frações são miricetina-3-galactosídeo, quercetina-3-O- β -galactopiranosídeo, quercetina-3-O- β -glucopiranosídeo e miricetina-3-O- α -ramnopiranosídeo (Kwon *et al.*, 2016).

2.3 Espécie *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze

Inicialmente designado como *Statice brasiliense* Boiss. (Candolle, 1864), foi apresentada por Kuntze (1891) pelo nome botânico *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. É conhecida, popularmente, como baicuru, guaicuru ou guaicurá, sendo uma erva perene, distribuída pela Argentina, Uruguai e sul do Brasil – Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul – preferencialmente em terrenos baixos e sujeitos à maré (solo salino) e nas margens do Rio da Prata (Moura *et al.*, 1985; Murray *et al.*, 2004). Segundo Der Pflanzenfamilien (1964), *L. brasiliense* é uma espécie pertencente à família Plumbaginaceae e à subfamília Staticeae. A espécie apresenta duas sinonímias – *L. brasiliense* var. *brasiliense* e *L. brasiliense* var. *patagonicum* (Speg.) Burkart (The Plant List, 2013).

A descrição morfo-anatômica das raízes de baicuru foi realizada pela primeira vez por Dias da Silva e estão relatadas somente na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (Dias Da Silva, 1920). Além disso, o baicuru é uma erva de 30 a 50 cm de altura, com folhas basilares, longamente pecioladas, disposta em rosetas, com flores pequenas, de cálice avermelhado e corola azulada dispostas em panículas piramidais (Moura *et al.*, 1985).

Estudos morfo-anatômicos foram realizados para auxiliar ao controle de qualidade da matéria prima, a fim de evitar amostras trocadas ou adulteradas. Devido à sua cor e crescimento parcialmente enterrado no solo arenoso do litoral, o rizoma desta espécie pode ser confundido com uma raiz principal tuberosa, podendo ser observado nas descrições de Reitz (1965). Como descrito por Dias da Silva (1920) o periderme possui tecidos pretos e no interior é castanho avermelhado. Assim, Antonelli-Ushirobira *et al.* (2015) determinaram que

para o *L. brasiliense* o farmacógeno trata-se de rizomas e não raízes. O rizoma do *L. brasiliense* é longo e grosso, com superfície marrom escura, carregando estrias longitudinais delicadas e pequenas e profundas fissuras transversais.

Estudos foram elaborados para desenvolver parâmetros de controle de qualidade dos rizomas de *L. brasiliense*, a fim de contribuir para a qualidade farmacognóstica dos extratos por meio de método validado por CLAE, que se mostrou específico, simples, sensível, preciso e reprodutível (Blainski, A. *et al.*, 2013).

Quimicamente a planta foi descrita inicialmente por Rosito (1975) o qual analisou um extrato hidroetanólico e verificou a presença de taninos hidrolisáveis, condensados, ácido-4-metóxi-gálico, β -sitosterol e saponinas triterpênicas. Posteriormente foi descrito a presença de taninos, leucoantocianinas, ácido hidroxicinâmico e ácido elágico nos rizomas (Medina *et al.*, 1977; Ragonese e Milano, 1984). Cardoso (1990) verificou a presença de ácido gálico, epicatequina e taninos condensados por técnica de CCD. De um extrato metanólico das raízes de *L. brasiliense* foi isolado miricetina-3-O- α -raminopiranosídeo, ácido gálico, epigallocatequina, galocatequina e epigallocatequina-3-O-galato. Também foi verificado a presença de ácido-4-metóxi-gálico, benzoato de benzila, sacarose, flavona, isoflavona, flavonona e cumarina (Moura *et al.*, 1985; Murray *et al.*, 2004).

O conteúdo de polifenóis totais (PT) do extrato dos rizomas de *L. brasiliense* foi determinado por método espectrofotométrico UV/VIS. O método desenvolvido e validado determinou 23,5% de PT no extrato, expressos em porcentagem de pirogalol (Blainski, A. *et al.*, 2013).

Foram verificadas atividades biológicas do extrato etanólico dos rizomas, como bacteriostática, anti-inflamatória e antagonista de bradicinina e ocitocina em associação com paracetamol (Jahns e Crescente, 1976).

Alguns estudos de avaliação biológica de extratos de *L. brasiliense* têm sido relatados. Rosito (1975) verificou a atividade do extrato hidroetanólico das raízes de baicuru frente à *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, entre outros. Faral-Tello *et al.* (2012) demonstraram interessante atividade antiviral de extrato etanólico de *L. brasiliense* frente ao vírus HSV-1, o qual inibiu a replicação *in vitro*, com EC₅₀ de 185 μ g/ml.

Murray *et al.* (2004) avaliaram a atividade antioxidante, pela determinação do IC₅₀ através da habilidade de quelar radicais livres usando o método de DPPH. Foi avaliado o extrato metanólico das raízes de *L. brasiliense*. Foi isolado miricetina-3-O- α -raminopiranosídeo como componente mais ativo (IC₅₀ = 40,0 μ M). O extrato metanólico, rico com esta substância apresentou IC₅₀ de 20,7 μ M. Também foi verificada a presença de ácido gálico, epigallocatequina, galocatequina e epigallocatequina-3-O-galato.

Moura *et al.* (1985) demonstraram ação anti-inflamatória do extrato etanólico, por via i.p, na dose de 250 mg/kg no teste do edema de pata induzido por carragenina.

Foi testada *in vitro* a atividade anti-inflamatória de extrato semipurificado de *L. brasiliense* e do composto isolado miricetina-3-O-ramnosídeo frente à superprodução de óxido nítrico pela linhagem de células RAW 264.7 estimuladas por LPS (lipopolissacarídeos), sendo que o composto isolado apresentou o melhor resultado (Rodriguez *et al.*, 2011).

No teste de toxicidade excessiva, o extrato, na dose de 2,0 g/kg, por meio da administração intravenosa (veia caudal), apresentou sinais expressivos de toxicidade (Moura *et al.*, 1985).

Testes toxicológicos *in vivo* executados por Antonelli-Ushirobira e colaboradores (2015) mostraram que os ratos e camundongos machos são mais susceptíveis aos efeitos do extrato hidro-acetônico de *L. brasiliense*, quando este é administrado em tratamento prolongado. Já os animais do sexo feminino toleraram a utilização prolongada do extrato. De acordo com os dados obtidos pelos autores pode-se concluir que o extrato de *L. brasiliense* apresenta baixa ou nenhuma toxicidade nas doses administradas aos animais (50, 100 e 200 mg/kg).

O extrato bruto produzido com acetona:água (70:30 v/v) de *L. brasiliense* foi administrado, via oral, em ratas imaturas, nas doses de 400, 800 e 1200 mg/kg, e avaliou-se que houve uma tendência em diminuir a idade de abertura do canal vaginal comparado com o grupo controle; uma tendência na atividade uterotrópica negativa sobre o útero; pela análise citológica da secreção vaginal, houve um prolongamento do ciclo estral com predomínio da fase diestro (período progesterônico) das ratas; e, pela avaliação histológica notou-se presença de estruturas morfológicas características da ação progesterônica. Esses dados sugerem que o extrato seco de *L. brasiliense* tem ação sobre o sistema hormonal feminino do tipo antiestrogênico (Blainski, 2010).

Um design Simplex Centróide foi realizado para produzir 15 diferentes tipos de extratos de *L. brasiliense* com misturas de água, metanol, etanol e acetona. Os extratos brutos e frações acetato de etila (FAE) foram testados para atividade antimicrobiana, demonstrando que VREfm (*Enterococcus faecium* resistente à Vancomicina) e MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à Metilicina) são susceptíveis (MIC < 78µg/mL) às FAEs de várias amostras. Além disso, foi confirmada a presença de ácido gálico, galocatequina e epigalocatequina através de análises de massas, podendo sugerir também a presença de monômeros e dímeros de galato de prodelfinidinas dos tipos A e B, bem como um galato de metila nos extratos de rizomas de *L. brasiliense* (Blainski *et al.*, 2017).

O extrato bruto de *L. brasiliense* produzido com acetona:água (7:3) foi testado *in vitro* para determinar o potencial antiadesivo frente à *Porphyromonas gingivalis* em células KB epiteliais humanas, demonstrando que em concentrações $\leq 100 \mu\text{g/mL}$, o extrato não possui citotoxicidade e não influencia na fisiologia celular. Na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, o extrato reduziu a capacidade de adesão de *P. gingivalis* em 80% nas células. Em concentrações de $20 \mu\text{g/mL}$, foi reduzida a ação proteolítica da arginina-gingipaína em 75%. Ademais, o perfil fitoquímico do extrato bruto indicou a presença de ácido gálico, epigalocatequina-3-O-galato e samarangeninas A e B como compostos majoritários (De Oliveira Caleare *et al.*, 2017).

2.4 Herpes simplex vírus tipo 1

Herpes simplex vírus tipo 1 (HSV-1) pertence à família Herpesviridae, família de vírus envelopados que causam síndromes em adultos e neonatos (Hassan *et al.*, 2015). HSV-1 e HSV-2 são os tipos de herpes vírus humanos mais estudados, sendo o HSV-1 comumente encontrado em infecções orofaciais e encefalites, enquanto o HSV-2 é responsável por infecções geniturinárias (Markham e Faulds, 1994).

Estruturalmente, o HSV-1 (figura 2) é formado por um genoma linear de DNA em dupla hélice, bem compactado de forma que suas extremidades estejam suficientemente próximas a fim de circularizar rapidamente no núcleo da célula. Este material está envolvido por um capsídeo que contém quatro partes: 1. Um nucleocapsídeo icosaédrico contendo o DNA viral com 68% de guanina/citosina; 2. Um tegumento – camada amorfa de proteínas que envolve o capsídeo; 3. Envelope - uma bicamada lipídica, na qual estão inseridas no mínimo, 12 glicoproteínas virais (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL, gM e gN) e diversas proteínas não glicosiladas, lipídios e poliaminas que são essenciais para as etapas de reconhecimento e evasão celular (White e Fenner, 1994; Whitley e Roizman, 2001; Watanabe, 2010).

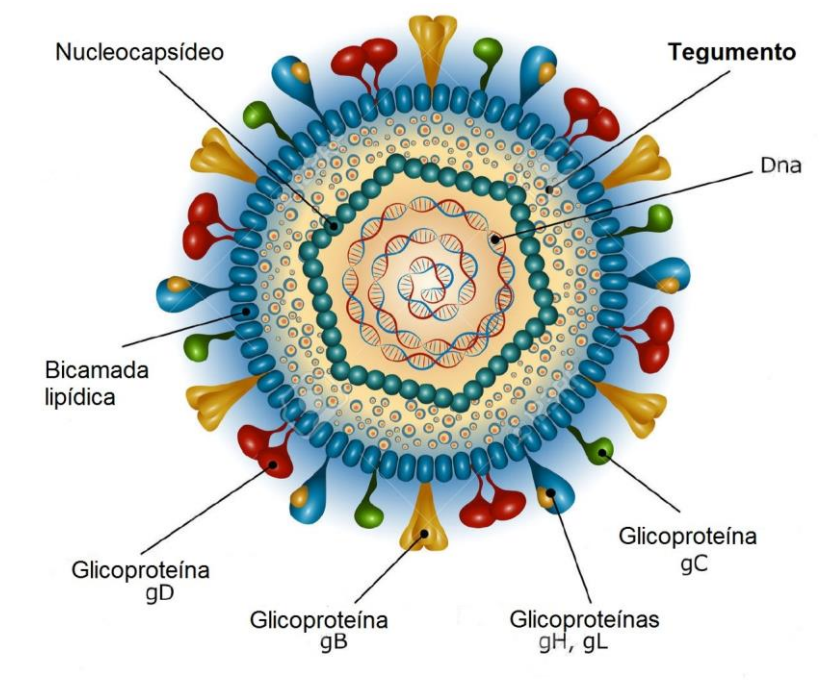


Figura 2 - Diagrama do vírion HSV-1.

Fonte: adaptado de https://www.123rf.com/photo_26068080_diagram-of-herpes-simplex-virus-particle-structure.html

Várias opções de tratamento para o herpes simples tipo 1 utilizando plantas medicinais têm sido apontadas (Trindade *et al.*, 2007).

Um polissacarídeo aniônico foi isolado do extrato aquoso de *Prunella vulgaris* L., exibindo efeito antiviral contra HSV-1 e HSV-2 em uma concentração de 100 µg/mL, não apresentando citotoxicidade. Essa atividade se deve a uma inibição competitiva do vírus pelos receptores celulares (Xu *et al.*, 1999).

Meliacina é um glicopeptídeo isolado de *Melia azedarach* L. capaz de inibir a multiplicação de HSV-1 *in vitro*, e também de prevenir o desenvolvimento de ceratite estromal herpética *in vivo* quando administrada três vezes por dia durante 4 dias (Paula Pifarré *et al.*, 2002).

Da planta *Rhus javanica* L. foram isolados dois triterpenos com atividade anti-herpética, chamados de ácido morônico e ácido betulônico. Os dois compostos exibiram *in vitro* um efeito inibitório contra HSV-1 com EC₅₀ de 3,9 e 2,6 µg/mL, respectivamente (Kurokawa *et al.*, 1999).

Notoginsenosídeo ST-4i, uma saponina isolada de *Panax notoginseng* (Burkill) F.H. Chen ex C.H. Chow, apresentou atividade inibitória *in vitro* contra HSV-1 e HSV-2 com valores de EC₅₀ de 16,4 e 19,44 µM, respectivamente (Pei *et al.*, 2011).

Foi isolado de *Plantago major* L. o ácido cafeico, que apresentou efeito inibitório *in vitro* contra HSV-1 e adenovírus tipo-3, com valores de EC_{50} de 15,3 e 87,3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (Chiang *et al.*, 2003).

A curcumina e seus derivados gálio-curcumina e Cu-curcumina, demonstraram efeito inibitório *in vitro* na replicação de HSV-1 em cultura celular com IC_{50} de 33,0, 13,9 e 23,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Zandi *et al.*, 2010).

Três flavonoides isolados do extrato etanólico de *Ficus benjamina* L. (quercetina-3-O-rutinosídeo, canferol-3-O-rutinosídeo e canferol-3-O-robinobiosídeo) apresentaram potente efeito inibitório em infecções de HSV, com índice de seletividade 266, 100 e 666, respectivamente. O canferol-3-O-robinobiosídeo demonstrou índice de seletividade comparável ao aciclovir (Yarmolinsky *et al.*, 2012).

Dois peptídeos foram isolados do veneno do escorpião *Heterometrus petersii* e testados para o efeito anti-HSV-1 *in vitro*. Ambos os peptídeos, nomeados Hp1036 e Hp1239, exibiram potente atividade virucida (EC_{50} $0,43 \pm 0,09$ e $0,41 \pm 0,06$ μM , respectivamente) e efeitos inibitórios ao vírus. Os peptídeos possuem estrutura α -hélice, capaz de destruir a morfologia viral. Além disso, os peptídeos reduziram a infecção viral em células Vero (Hong *et al.*, 2014).

Usando um fracionamento bioguiado, um peptídeo antiviral nomeado 2kD foi isolado das cascas de *Sorghum bicolor* L. e testado contra HSV-1, apresentando EC_{50} 6,25 μM e CC_{50} 250 μM (Camargo Filho *et al.*, 2008).

Epigallocatequina galato (EGG) isolada de *Thea sinensis* L., é uma substância antioxidante potente e revelou a habilidade de inativar vírions de HSV por blindagem de Gb, gD ou outras glicoproteínas do envelope viral. Entretanto, EGG modificada (palmitoil-EGG) teve seu efeito avaliado em células Vero infectadas com HSV e mostrou uma atividade inibitória mais potente que EGG em uma concentração de 50 μM (De Oliveira *et al.*, 2013).

Do extrato aquoso de *Cocos nucifera* L. foi isolado catequina que mostrou atividade antiviral em células Vero infectadas com HSV-1 resistente ao aciclovir (HSV-1-ACVr) com índice virucida de 3,25 (Esquenazi *et al.*, 2002).

A partir do extrato acetônico de *Rumex acetosa* L. foram realizados testes contra HSV-1, obtendo um resultado de CC_{50} de $78,6 \pm 12,7$ $\mu\text{g/mL}$, demonstrando 100% de atividade antiviral em concentrações maiores que 1 $\mu\text{g/mL}$, correspondendo a um IC_{50} de $0,8 \pm 0,04$ $\mu\text{g/mL}$. O índice de seletividade foi de 100,7. No mesmo estudo foram realizados testes para investigação de estrutura-atividade, podendo relatar que os compostos isolados

epicatequina, epigallocatequina, galocatequina e procianidina B2 possuem moderada atividade antiviral, porém quando as mesmas substâncias possuem ligação com ácido gálico (epicatequina-3-O-galato, epigallocatequina-3-O-galato e procianidina B2-di-galato) há um aumento contrastante da atividade. Já o ácido gálico livre não demonstra atividade antiviral (Gescher *et al.*, 2011).

Um estudo de uma amostra de taninos preparada a partir de extrato de caqui demonstrou que o extrato possui a capacidade de inativar vírus, suprimindo a infecção viral em concentrações não citotóxicas (Ueda *et al.*, 2013).

Três elagitaninos foram testados (castalagina, vescalagina e grandinina) e exibiram um forte efeito inibitório na replicação de HSV-1 resistente ao aciclovir em células MDBK. Os valores de IC₅₀ foram 0,04 ± 0,002, 0,06 ± 0,003 e 0,04 ± 0,02 µM respectivamente e índice de seletividade de 877,5, 436,7 e 713,0 respectivamente (Vilhelmova-Ilieva *et al.*, 2014).

Estudos com extratos de plantas da medicina tailandesa mostraram que as plantas *Aglaia odorata* Lour., *Moringa oleifera* Lam. e *Ventilago denticulata* Willd. possuem atividade anti-HSV-1, com EC₅₀ 9,5 ± 0,7, 100 ± 5,3 e 46,6 ± 1,5 µg/mL, CC₅₀ 312 ± 17, 875 ± 35 e 838 ± 53 µg/mL e índice de seletividade de 32,9, 8,8 e 18,1 respectivamente. Em testes com ratos, os extratos das plantas administradas oralmente reduziram significativamente o desenvolvimento e progressão de lesões herpéticas na pele dos animais (Lipipun *et al.*, 2003).

Cornus canadenses L., uma planta americana usada na medicina tradicional para tratamento de infecções virais, foi testada para sua atividade anti-HSV-1. Os resultados mostraram que o extrato hidroetanólico das folhas atua diretamente sobre o vírus e também sobre a absorção do vírus pelas células. Em um estudo bioguiado, taninos hidrolisáveis foram isolados da fração de maior atividade (*n*-butanólica) e mostraram boa atividade anti-HSV-1, sendo o composto mais ativo o telimagrandina, com EC₅₀ de 5,0 ± 0,2 e 2,6 ± 0,1 µM para absorção e modo direto, respectivamente (Lavoie *et al.*, 2017).

Uma avaliação do efeito anti-herpético do extrato bruto das cascas de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Aroeira) contra HSV-1, demonstrou que o extrato possui ação anti-HSV-1 *in vitro* e atua nos estágios iniciais de replicação viral, diretamente na partícula de vírus, e bloqueia a entrada do vírus nas células. Nos testes *in vivo*, o extrato reduziu as lesões causadas, fazendo com que as mesmas demorassem mais a aparecer, fossem mais brandas e mais rápidas de curar. Além disso, taninos condensados foram identificados no extrato, sendo o composto majoritário a catequina. Os outros constituintes são uma mistura de monômeros, dímeros e trímeros de flavan-3-ols (Nocchi *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi isolar substâncias da droga vegetal por meio de métodos cromatográficos, e identificar as substâncias químicas por métodos de análise estrutural para posterior análise de atividade biológica frente a Herpes simplex vírus tipo I.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Desenvolvimento de metodologia para isolamento das substâncias majoritárias presentes no extrato e frações.

3.2.2 Elucidação estrutural das substâncias fenólicas por meio de métodos espectroscópicos e espectrométricos.

3.2.3 Avaliação da atividade antiviral do extrato bruto, frações semipurificadas e substâncias isoladas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Droga vegetal

Os rizomas de *Limonium brasiliense* foram adquiridos em Rio Grande, Ilha dos Marinheiros (31°59'33"S, 52°10'43"W), Rio Grande do Sul, Brasil, em maio de 2010. As amostras foram armazenadas no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (UEM) sob número HUEM 21151 sob responsabilidade de João Carlos Palazzo de Mello. O material vegetal foi coletado com permissão do IBAMA-SISBIO e registrado sob número 11995-3 em 2 de novembro de 2010, código de autenticação 46367613, sob responsabilidade de J. C. P. Mello. O acesso ao material botânico foi autorizado e licenciado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), registrado pelo número 010252/2015-0. A droga vegetal foi seca em estufa de circulação de ar em temperatura de 37 ± 2 °C, em seguida moída em moinho de martelos (Tigre ASN-5).

4.2 Preparo de extrato bruto e fração acetato de etila

4.2.1 Extrato bruto dos rizomas de *Limonium brasiliense*

A droga vegetal foi submetida a processo de extração por Ultra-Turrax (UTC115KT, Ika Works), utilizando-se acetona:água (7:3; v/v) como líquido extrator, numa proporção de 1:10 (m/v). A extração foi realizada durante 30 min, com intervalos de 5 em 5 min para que a temperatura de extração fosse mantida abaixo de 40 °C, não danificando as substâncias presentes na droga vegetal (Blainski, Andressa *et al.*, 2013).

O extrato foi filtrado em funil de Büchner, sob pressão reduzida. Concentrou-se o filtrado em evaporador rotatório sob pressão reduzida até que todo o solvente orgânico fosse eliminado. Após, o extrato foi congelado com nitrogênio líquido e liofilizado, obtendo-se o extrato bruto (EB).

4.2.2 Partição Líquido-Líquido a partir do EB

Realizou-se a partição líquido-líquido utilizando acetato de etila como líquido extrator. Foram dissolvidos 40 g do EB em 400 mL de água destilada e adicionaram-se 400 mL de acetato de etila em funil de separação. A fase acetato de etila (FAE) foi separada e reservada. Após, retornou-se a fase aquosa (FAQ) ao funil de separação e repetiu-se o processo de adicionar acetato de etila por mais nove vezes, a fim de extrair o máximo possível de compostos fenólicos que possuem afinidade com o solvente orgânico (Mello *et al.*, 1996). As fases acetato de etila foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida, até que todo o solvente orgânico fosse eliminado. A fase orgânica foi

congelada com nitrogênio líquido e liofilizada. Esse mesmo processo foi realizado com a fração aquosa.

4.3 Isolamento

4.3.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração acetato de etila

A FAE foi fracionada empregando-se uma coluna de vidro (altura: 750 mm e diâmetro: 55 mm) contendo Sephadex LH-20 como fase estacionária. Após limpeza apropriada com ácido acético glacial 2%, a coluna foi estabilizada com etanol puro. Ao topo da coluna, com auxílio de pipeta, foram adicionados 5 g da FAE, previamente diluída com o mínimo de etanol, empregando-se a sequência de fases móveis em proporção volumétrica:

1. Etanol
2. Metanol
3. Acetona/água (7:3)

Foram coletadas amostras de 10 mL em tubos de ensaio com monitoramento das mesmas por CCD (seção 4.3.3). As frações resultantes foram reunidas por semelhança, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida até eliminação total do solvente orgânico, congeladas e liofilizadas (De Oliveira Caleare *et al.*, 2017).

4.3.2 Análise das subfrações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE foi utilizada para avaliação das subfrações obtidas da cromatografia em coluna da FAE.

4.3.2.1 Preparo das amostras para análise por CLAE

As subfrações obtidas foram preparadas em concentração de 1 mg/mL, pesando 1 mg de cada e solubilizando em 1 mL de metanol 20% (v:v). A solução foi aplicada no injetor cromatográfico com auxílio de microseringa com capacidade para 100 µL.

4.3.2.2 Equipamento e condições cromatográficas para análise por CLAE

As amostras preparadas (seção 4.3.2.1) foram analisadas em CLAE da marca Knauer, modelo Azura, equipado com bomba P 4.1S de 10 mL, com injetor manual, alça de injeção de 20 µL, degasser DG 2.1S de dois canais e detector UVD 2.1S. Os cromatogramas foram observados a 254 nm. O sistema de controle foi realizado pelo software ClarityChrom®.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando metanol:água 30:70 (v/v) acidificado com ácido fórmico até pH 2,5 em sistema isocrático, com vazão de 1mL/min e coluna Agilent Zorbax C18 (250 mm x 4,6 mm) 5 µM.

4.3.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD foi realizada em cromatofolhas de alumínio com gel de sílica 60 F254 (Merck) com 0,200 mm de espessura, utilizando-se como sistema eluente acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v). As substâncias foram visualizadas sob luz UV a 254 nm. A revelação química realizou-se com solução de cloreto férrico a 1% em metanol.

4.4 Análise estrutural

4.4.1 Espectrometria de massas

As frações purificadas e substâncias isoladas foram analisadas por meio de espectrometria de massas (EM) por injeção direta. O espectrômetro de massas utilizado foi de baixa resolução, do tipo triplo quadrupolo (Waters), com fonte de ionização do tipo *electrospray* (ESI), operado com modo de aquisição MS e tune do equipamento na faixa de 100 – 1000 *m/z*. As análises foram realizadas em modo negativo de ionização, com voltagem do capilar de 3.00 kV, temperatura da fonte 300 °C e fluxo do gás de dessolvatação 700 L/H.

Os espectros de massas obtidos foram visualizados através do software MassLynx® 4.1 e comparados com a literatura.

4.4.2 Derivatização química

Para quantidades de até 100 mg de substância, foram adicionados 1 mL de piridina e 1 mL de anidrido acético em balão de fundo redondo de 100 mL e a mistura foi deixada em repouso por 24 h. Após, foi adicionado gelo picado interna e externamente ao balão, deixando em repouso por 2 h. A solução foi filtrada sob pressão reduzida através de funil de vidro sinterizado G3 e a substância acetilada foi lavada com água gelada até completa eliminação da piridina. A substância acetilada foi solubilizada em acetona e a retirada do solvente foi realizada através de evaporador rotatório sob pressão reduzida de forma sucessiva até total eliminação da piridina. A substância foi transferida para um frasco e colocada em capela de exaustão à temperatura ambiente para total eliminação do solvente. Após, a substância foi congelada e liofilizada (Mello *et al.*, 1996).

4.4.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN unidirecionais (1D) (¹H) foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III, operando a 300 MHz para prótons. As amostras foram dissolvidas em 700 µL de acetona deuterada [(CD₃)₂CO]. Os espectros das substâncias foram analisados e comparados com dados constantes na literatura.

4.5 Atividade biológica

4.5.1 Ensaios de citotoxicidade em cultura de células

Placas de 96 poços foram preparadas com monocamada de células VERO e incubadas até confluência. Para os ensaios de citotoxicidade, diluições seriadas (31,25 - 62,50 - 125 - 250 - 500 - 1000 µg/mL e 3,125 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 µg/mL) das amostras foram preparadas e adicionaram-se 200 µL/poço de cada concentração. Foram realizados três ensaios independentes no qual cada concentração da amostra foi testada em triplicata. Assim, a placa foi incubada por 72h, a 37,0 °C e 5,0% CO₂.

A citotoxicidade foi determinada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ destruição celular} = 1 - \left(\frac{DO_{\text{ttdo}}}{DO_{\text{cc}}} \right) \times 100,$$

onde DO ttdo é a densidade óptica dos tratados e DO cc é a densidade óptica do controle de células.

4.5.2 Ensaio de atividade antiviral contra Herpes simplex vírus tipo I

Foram adicionados 25 µL de suspensão viral TCID₅₀ (tissue culture infective dose 50% - dose infectiva de 50%) de HSV-1 cepa KOS (sensível ao aciclovir) e incubado por 1h, a 37,0 °C, em estufa com 5,0% CO₂. Após a incubação, foram adicionados sobre a monocamada 175 µL/poço de cada concentração (1,5625 - 3,125 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 µg/mL) das amostras. Foram realizados três ensaios independentes nos quais cada concentração da amostra foi testada em triplicata, e a placa foi acondicionada como descrito anteriormente. Utilizou-se como controle positivo a droga Aciclovir.

A atividade antiviral para a cepa KOS foi determinada de acordo com o percentual de inibição do efeito citopático, a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição} = \left[\frac{(DO_{\text{ttdo}} - DO_{\text{cv}})}{(DO_{\text{cc}} - DO_{\text{cv}})} \right] \times 100,$$

onde DO ttdo é a densidade óptica do tratado, DO cv é a densidade óptica do controle de vírus e DO cc é a densidade óptica do controle de células.

4.5.3 Leitura das placas (teste de MTT)

Após as 72h de incubação, foram adicionados às células 50 µL de solução de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} em PBS (phosphate-buffered saline) e as placas foram incubadas em estufa ao abrigo da luz por 4 h. O sobrenadante foi então removido e foram adicionados 150 µL de DMSO nos poços para solubilização do sal de formazan formado. As placas foram agitadas e lidas em leitor de microplacas

(Espectrofotômetro ASYS HITECH GmbH Áustria modelo UVM-340) em comprimento de onda de 570 nm (Mosmann, 1983).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Isolamento

6.1.1 Cromatografia em coluna (CC) da fração semipurificada acetato de etila

De acordo com a metodologia, por fracionamento preparativo foram obtidas 34 subfrações da FAE dos rizomas de *L. brasiliense*. As frações foram nomeadas 1-34 e resultaram em rendimento final de 80,80%.

6.1.2 Análise das subfrações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As subfrações obtidas pela CC foram preparadas e analisadas em CLAE, conforme a metodologia descrita. As amostras que se mostraram mais purificadas foram selecionadas para análises posteriores.

6.2 Análise estrutural

A epigalocatequina-3-O-galato foi obtida nas subfrações 9, 10 e 10.1 (517,5 mg), representando 10,35 % da FAE. No cromatograma da subfração 10 (figura 3, p. 33) há a presença de um pico em 8,69 min. Na análise por EM (figura 4, p. 33), pode-se sugerir a substância epigalocatequina-3-O-galato, através do íon desprotonado com m/z $[M-H]^-$ 457, compatível com $C_{22}H_{17}O_{11}$. A presença de unidade de (epi)galocatequina pode-se confirmar pela perda de 305 u e ácido gálico pela perda de 169 u da substância acetilada. O espectro de 1H e os dados (figura 5 e tabela 1, p. 34) mostram o H-3 em δ 5,97 ppm, o H-2 em δ 5,74 ppm e H-4 equatorial e axial em δ 3,41 e 3,27 ppm respectivamente. A constante de acoplamento para $J_{2,3} \leq 1$, característico da configuração *cis*, confirmando a unidade de flavan-3-ol como sendo epigalocatequina. Os três substituintes no anel B são confirmados pelo singlete de dois H em δ 7,62 ppm (integral = 1,29), característico de H-2' e H-6'. O sinal em δ 7,83 ppm é característico de um singlete representando dois H (integral = 1, 1H = 0,53) do H-2'' e H-6'' da unidade galoil (anel tri-hidroxilado). Os resultados são compatíveis com resultados previamente publicados (De Oliveira Caleare *et al.*, 2017).

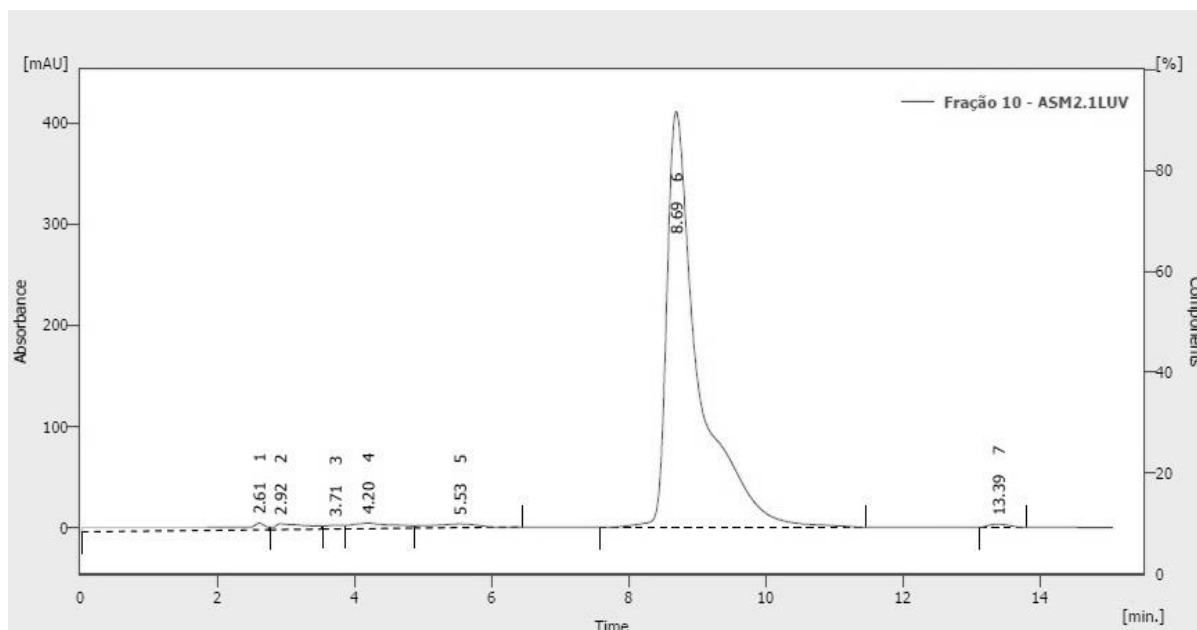


Figura 3 - Cromatograma da subfração 10 obtida da FAE de *Limonium brasiliense* por meio de coluna contendo Sephadex LH20. Substância: epigallocatequina-3-O-galato.

Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (30:70 v/v), pH 2,5, vazão 1 mL/min, coluna Agilent Zorbax C18, 254 nm.

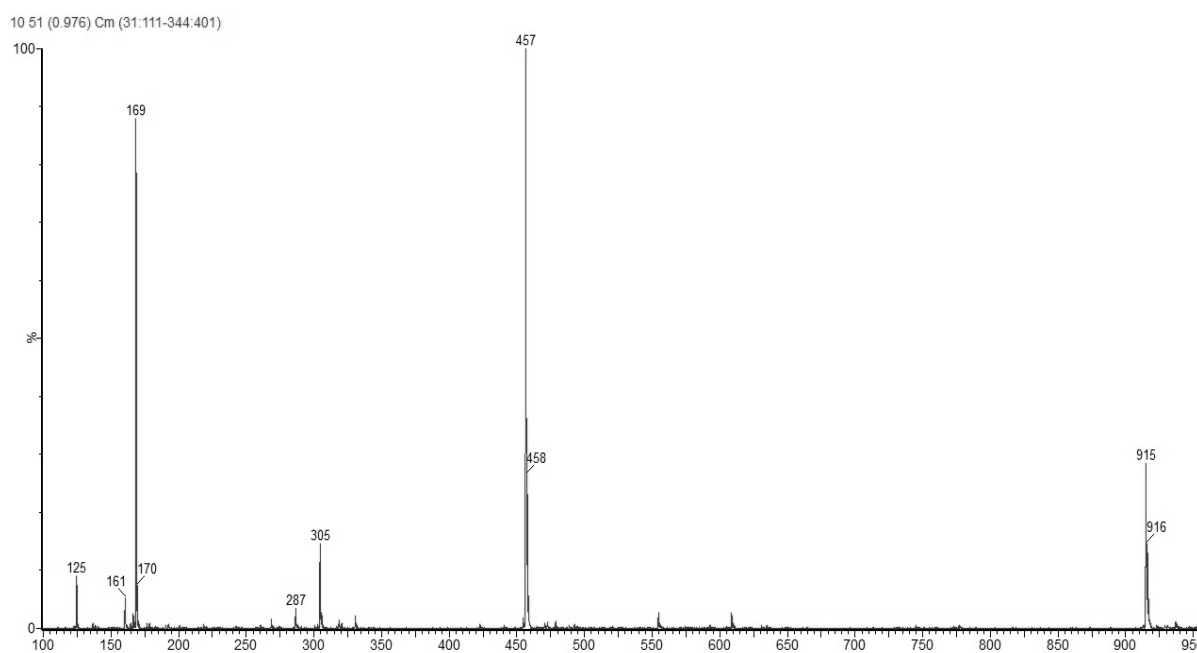


Figura 4 - Espectro de massas da epigallocatequina-3-O-galato.

Equipamento de baixa resolução, triploquadropolo (Waters), ionização ESI, 3.00 kV, 300 °C, 700 L/H.

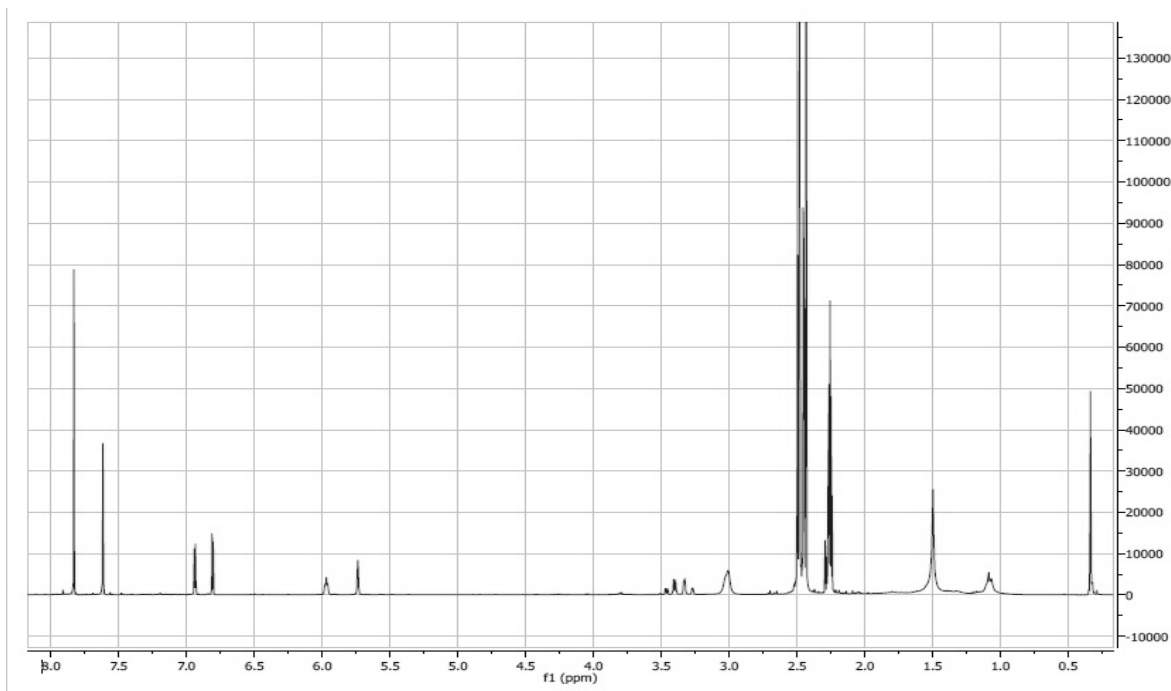


Figura 5 - Espectro de RMN de ^1H da epigallocatequina-3-O-galato acetilada.

Espectrômetro Bruker Avance III, 300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

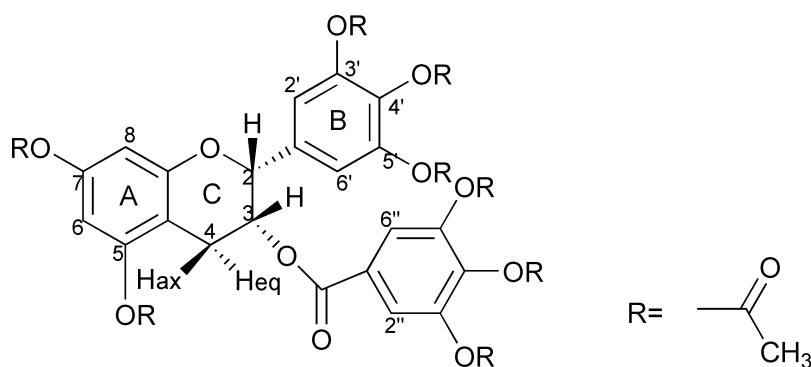
Tabela 1 - Dados da substância epigallocatequina-3-O-galato (300 MHz, ^1H , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).

H	^1H δ (ppm)	Multiplicidade/J (Hz)	Integrais
Grupo O-Ac	2,24-2,51	m	
4_{ax} (C)	3,27-3,33	dd $^2\text{J H-}4_{\text{ax}} - \text{H-}4_{\text{eq}} = 18,0$ $^3\text{J H-}4_{\text{ax}} - \text{H-}3 = 2,07$	0,73
4_{eq} (C)	3,39-3,47	dd $^2\text{J H-}4_{\text{eq}} - \text{H-}4_{\text{ax}} = 18,0$ $^3\text{J H-}4_{\text{eq}} - \text{H-}3 = 4,41$	0,65
2 (C)	5,74	s	0,60
3 (C)	5,96-5,98	m^*	0,57
6 (A)	6,81	d $^4\text{J H-}6 - \text{H-}8 = 2,25$	0,53
8 (A)	6,94	d $^4\text{J H-}8 - \text{H-}6 = 2,25$	0,57
2'/6' (B)	7,62	s	1,29

2''/6''	7,83	s	1,00
---------	------	---	------

δ = deslocamento, J = constante de acoplamento, s = singlete, d = dubleto, dd = duplo dubleto, m = multipleteo

* Não passível de identificação.



Estrutura química 3 - Estrutura molecular sugerida de epigallocatequina-3-O-galato acetilada.

A samarangenina A foi obtida das subfrações 13, 14, 15 e 16 (288,2 mg), representando 5,76 % da FAE. No cromatograma da subfração 16 (figura 6, p. 36) há a presença de um pico em 4,29 min. Na análise por EM (figura 7, p. 36), pode-se sugerir a substância samarangenina A, por meio do íon desprotonado com m/z $[M-H]^-$ 759, compatível com $C_{37}H_{28}O_{17}$. A presença de unidade de ácido gálico é confirmada pela perda de 169 u (De Oliveira Caleare *et al.*, 2017). Para confirmar a elucidação estrutural, foram realizadas análises por RMN 1D da substância acetilada. O espectro de 1H (figura 8 e tabela 2, p. 37) mostram que os H-4 equatorial e axial estão presentes em δ 3,30 ppm como um multipleteo. A constante de acoplamento para $J_{2,3} \leq 1$ de C e F, é característica da configuração *cis*, confirmando as unidades de flavan-3-ol como sendo epigallocatequina. O H-2 (F) e H-3 (F) estão em δ 5,11 e 5,78 ppm respectivamente. Os hidrogênios H-2 (C), H-3 (C) e H-4 (C) estão presentes em δ 6,22, 5,89 e 4,67 ppm respectivamente. Os sinais dos hidrogênios H-6 (A) e H-8 (A) estão presentes em δ 6,51 e 6,55 ppm, com $J = 2,43$, demonstrando que estão meta acoplados no anel A. O sinal de 1 H em δ 7,03 ppm é correspondente ao H-6 (D), comprovando a ligação entre as duas unidades de flavonóides. O dubleto em δ 7,63 ppm define a presença do H-6' (B), sugerindo a ligação entre o H-2' (B) e a unidade galol de C-3 (F) (Nonaka *et al.*, 1992; De Oliveira Caleare *et al.*, 2017). Análises de COSY serão realizadas para confirmar a posição de cada próton.

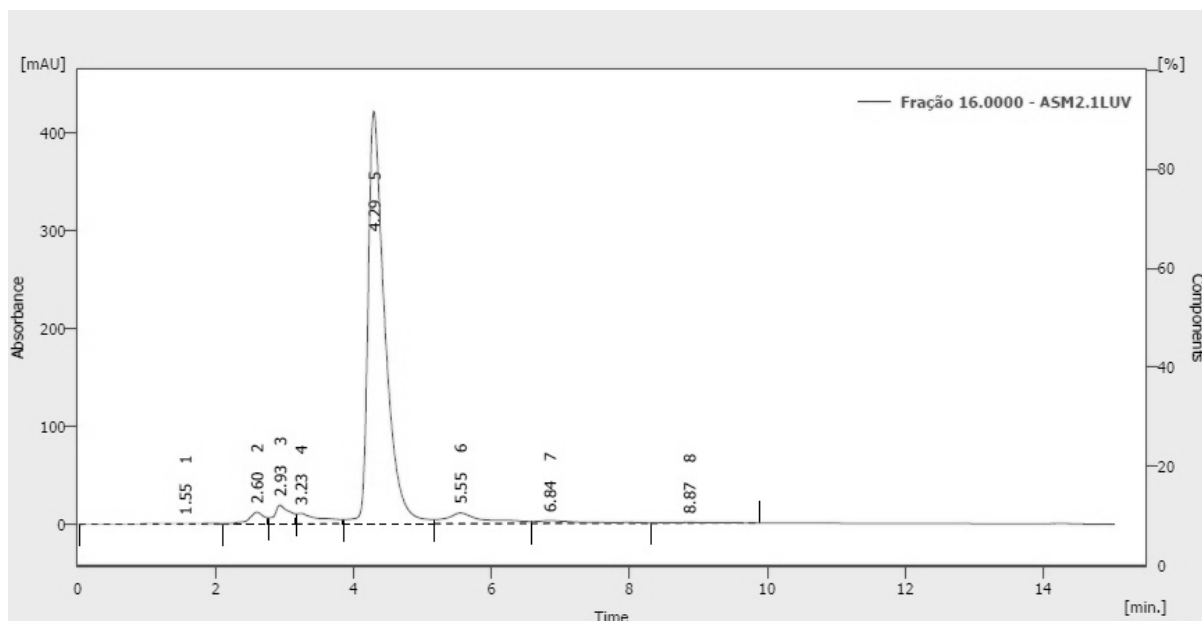


Figura 6 - Cromatograma da subfração 19 obtida da FAE de *Limonium brasiliense* por meio de coluna de Sephadex LH20. Substância: samarangenina A.

Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (30:70 v/v), pH 2,5, vazão 1 mL/min, coluna Agilent Zorbax C18, 254 nm.

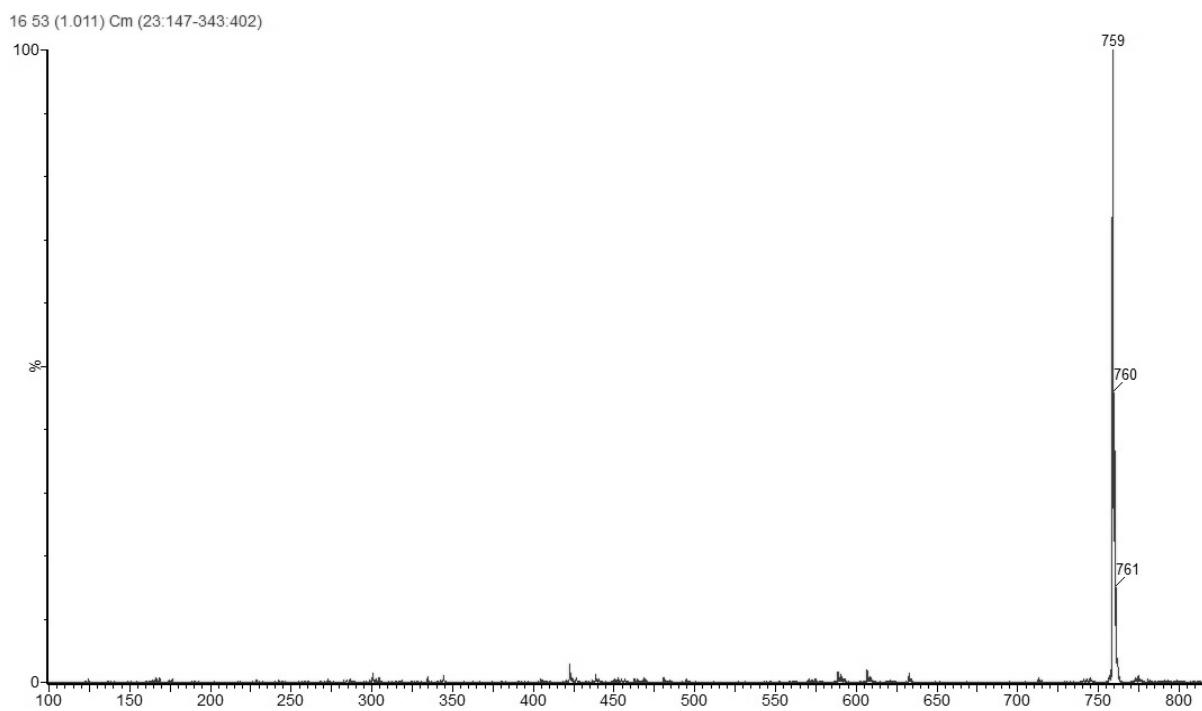


Figura 7 - Espectro de massas da samarangenina A.

Equipamento de baixa resolução, triploquadrupolo (Waters), ionização ESI, 3.00 kV, 300 °C, 700 L/H.

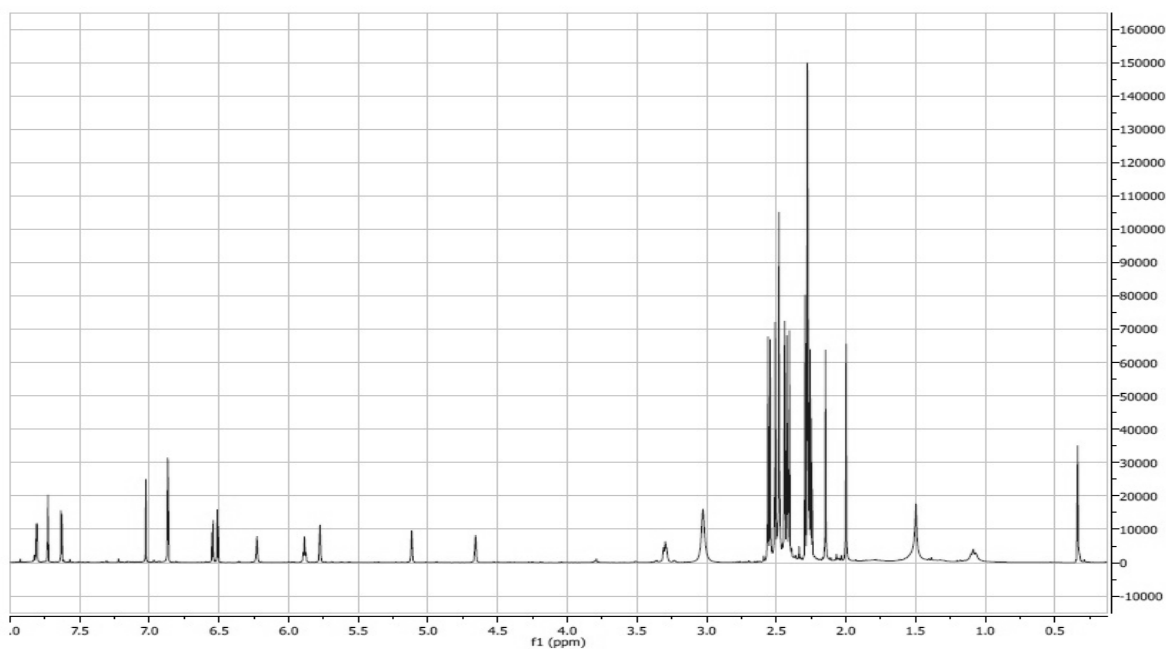


Figura 8 - Espectro de RMN de ^1H da samarangenina A acetilada.

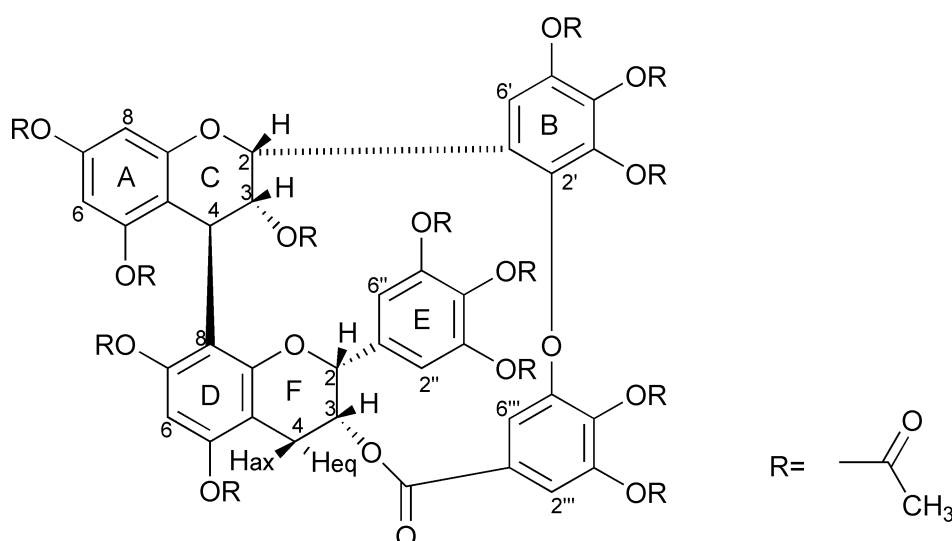
Espectrômetro Bruker Avance III, 300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

Tabela 2 - Dados da substância samarangenina A (300 MHz, ^1H , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).

H	^1H δ (ppm)	Multiplicidade/J (Hz)	Integrais
Grupo O-Ac	2,0 – 2,55	m	
$4_{\text{ax}}/4_{\text{eq}}$ (F)	3,25 - 3,30	pm	2,64
4 (C)	4,65	s	1,19
2 (F)	5,10	s	1,22
3 (F)	5,75	m	1,20
3 (C)	5,80	m	1,21
2 (C)	6,24	s	1,19
6 (A)	6,51	d $^4\text{J H-6} - \text{H-8} = 2,43$	1,00
8 (A)	6,54 – 6,55	d $^4\text{J H-8} - \text{H-6} = 2,43$	1,03
$2'/6'$ (E)	6,87	s	2,06

6 (D)	7,03	s	1,01
6' (B)	7,63	d	0,94
6'''	7,73	s	0,93
2''/6'' e H2'''	7,81		1,00

δ = deslocamento, J = constante de acoplamento, s = singleto, d = dubleto, dd = duplo dubleto, m = multipeto, pm = pseudo multipeto



Estrutura química 4 - Estrutura molecular sugerida de samarangenina A acetilada.

A samarangenina B foi obtida das subfrações 17, 18, 19 e 20 (977,9 mg) representando 19,55 % da FAE. No cromatograma da subfração 19 (figura 9, p. 39) há a presença de um pico em 4,10 min. Na análise por EM (figura 10, p. 40), pode-se sugerir a substância samarangenina B, através do íon desprotonado com m/z $[M-H]^-$ 911, compatível com $C_{44}H_{31}O_{22}$ (Kuo *et al.*, 2002; De Oliveira Caleare *et al.*, 2017). Para complementar as análises de elucidação estrutural, foram realizadas análises por RMN 1D da substância acetilada. O espectro de 1H e dados (figura 11 e tabela 3, p. 40) mostram a presença de duas unidades de flavan-3-ol, ambas com configuração *cis* ($J_{2,3} \leq 1$), o que é uma característica de unidade de epigallocatequina. Os H-4 equatorial e axial estão presentes em δ 3,32 ppm como um multipeto. O H-2 (F) e H-3 (F) estão em δ 5,15 e 5,89 ppm respectivamente. Os hidrogênios H-2 (C), H-3 (C) e H-4 (C) estão presentes em δ 6,31, 6,03 e 4,92 ppm. A presença dos sinais dos hidrogênios H-6 (A) e H-8 (A) em δ 6,52 e 6,60 ppm com $J = 2,43$ demonstra um meta acoplamentos desses hidrogênios no anel A e o único sinal de H-6 (D) em δ 7,05 comprova a ligação entre as duas unidades de flavonóides. O singleto presente em δ 7,67 ppm define a presença do H-6' (B), sugerindo a ligação entre o H-2' (B) e a unidade galoil de C-3 (F). Os hidrogênios da unidade inferior de galoil estão em

$\delta = 6,87$ ppm, em um singlete com valor de integral de 0,71 (1H = 0,32). O singlete em $\delta 7,85$ ppm (integral = 1, H = 0,32) confirma a presença da unidade galoil em C-3 (C). Esse singlete está sobreposto com um dubleto, o qual tem correlação com o dubleto em $\delta 7,67$ ppm. Ambos os dubletos são parte da segunda unidade galoil, que é ligada no C-3 (F). A presença de dois dubletos ao invés de um singlete de dois prótons sugere uma substituição no C-3''' da unidade galoil (Nonaka *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 2000; De Oliveira Caleare *et al.*, 2017). Análises de COSY serão realizadas para confirmar a posição de cada próton.

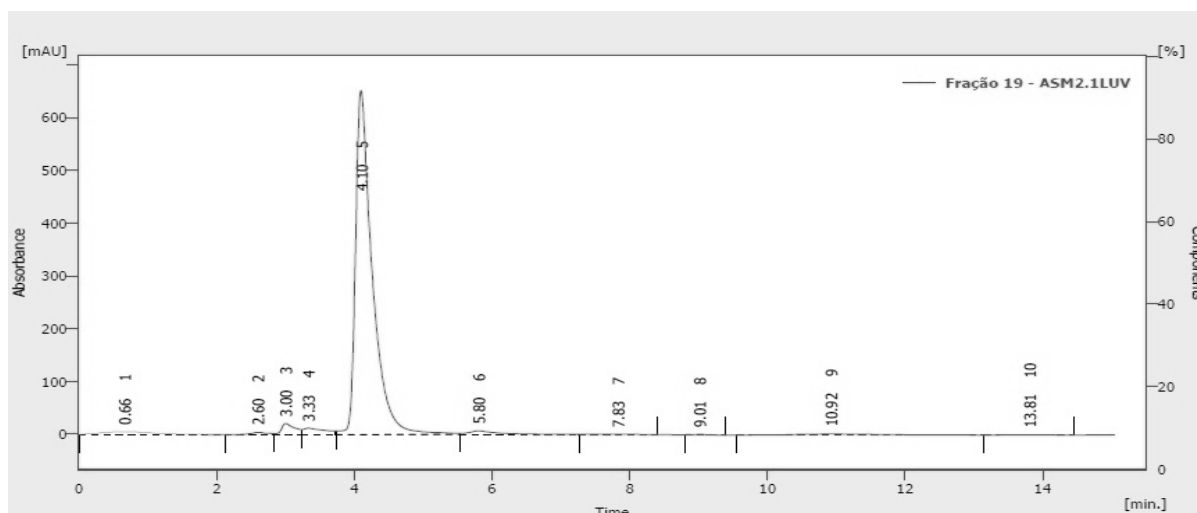


Figura 9 - Cromatograma da subfração 19 obtida da FAE de *Limonium brasiliense* por meio de coluna contendo Sephadex LH20. Substância: samarangenina B.

Condições cromatográficas: fase móvel metanol:água (30:70 v/v), pH 2,5, vazão 1 mL/min, coluna Agilent Zorbax C18, 254 nm.

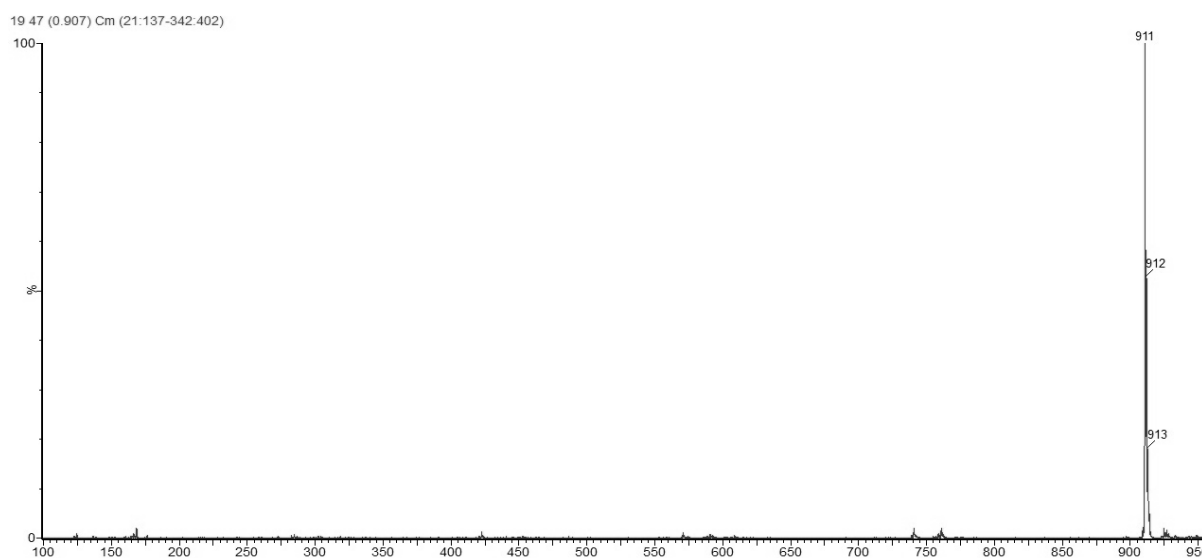


Figura 10 - Espectro de massas da samarangenina B.

Equipamento de baixa resolução, triploquadrupolo (Waters), ionização ESI, 3.00 kV, 300 °C, 700 L/H.

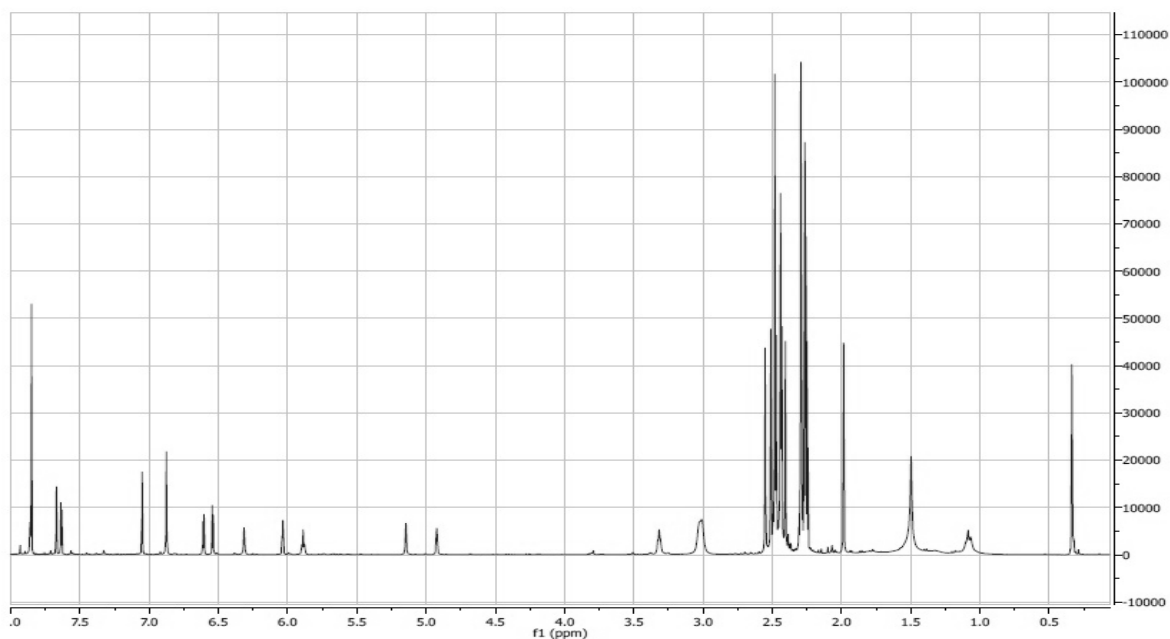


Figura 11 - Espectro de RMN de ^1H da samarangenina B acetilada.

Espectrômetro Bruker Avance III, 300 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$.

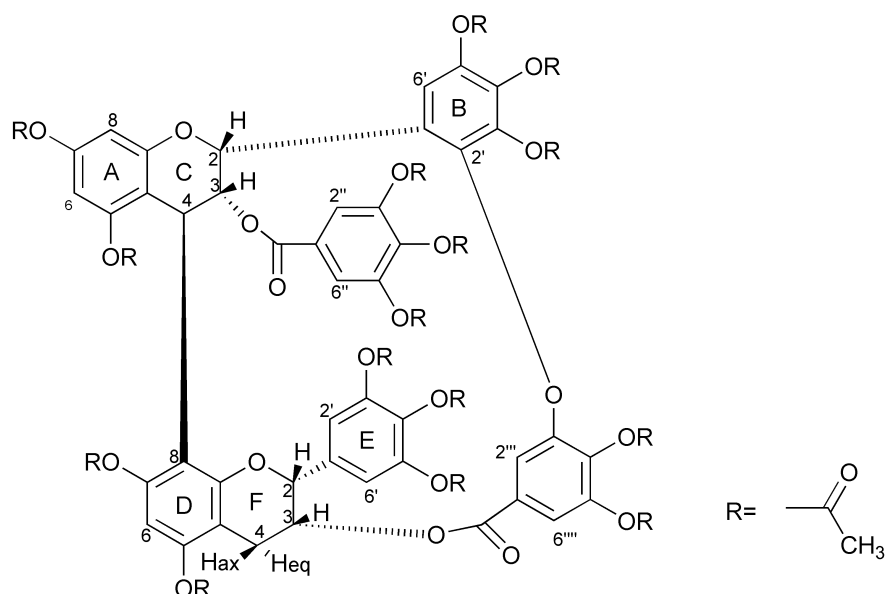
Tabela 3 - Dados da substância acetilada samarangenina B (300 MHz, ^1H , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).

H	^1H δ (PPM)	Multiplicidade/J (Hz)	Integrais
Grupo O-Ac	1,99-2,48	m	
$4_{\text{ax}}/4_{\text{eq}}$ (F)	3,32	d*	0,68
4 (C)	4,92	s	0,34
2 (F)	5,15	s	0,32
3 (F)	5,89	m	0,35
3 (C)	6,03	m	0,33
2 (C)	6,31	s	0,34
6 (A)	6,54	d $^4\text{J H-6} - \text{H-8} = 2,43$	0,32
8 (A)	6,60	d $^4\text{J H-8} - \text{H-6} = 2,43$	0,32

2'/6' (E)	6,87	s	0,71
6 (D)	7,05	s	0,33
6' (B)	7,63	d	0,32
6'''	7,67	s	0,32
2'''	7,85	d sobreposto	1,00
2''/6''		s	

δ = deslocamento, J = constante de acoplamento, s = singlete, d = dubleto, dd = duplo dubleto, m = multipeto

* Não passível de identificação.



Estrutura química 5 - Estrutura molecular sugerida de samarangena B acetilada.

6.3 Atividade biológica

6.3.1 Ensaios de citotoxicidade em cultura de células

Para os ensaios de citotoxicidade foram testados o EB, FAQ, FAE, FLB7 (fração semipurificada que reúne as três substâncias majoritárias da FAE) e as substâncias majoritárias isoladas: samarangena A, samarangena B e epigallocatequina-3-O-galato. Os resultados obtidos estão presentes na tabela 4 (p. 42).

Tabela 4 - Citotoxicidade de extrato, frações e isolados de *Limonium brasiliense* em células Vero.

Amostra	CC ₅₀ (µg/ml) ± DP
Extrato Bruto	85 ± 5
Fração Aquosa	56,67 ± 11,55
Fração Acetato de Etila	41,67 ± 12,58
FLB7	43,33 ± 5,77
Epigallocatequina-3-O-galato	66,67 ± 15,28
Samarangenina A	33 ± 7
Samarangenina B	45 ± 5,77

CC₅₀ = Concentração que destrói 50% da monocamada de células Vero

DP = Desvio padrão

Número de experimentos independentes: 3

Nos ensaios de citotoxicidade mostrados na tabela 5, foi demonstrado que o EB possui o menor valor de CC₅₀, correspondendo a 85 ± 5 µg/mL. No trabalho realizado por Faral-Tello e colaboradores (2012), o valor de CC₅₀ encontrado foi de 848 µg/mL, isso se deve ao fato de o EB ter sido produzido com etanol 70%, enquanto que nesse trabalho, o EB é hidro-acetônico ou acetoaquoso, possuindo alta concentração de taninos que podem ser mais tóxicos às células. Outro fato que pode desencadear discrepância dos resultados é de que no trabalho realizado por Faral-Tello, a metodologia utilizada para avaliação de citotoxicidade foi cristal violeta, um método que cora as células aderentes, podendo incluir as células mortas devido a não especificidade da coloração (Denizot e Lang, 1986; Sudo *et al.*, 1994), enquanto que nesse trabalho, utilizou-se MTT, uma metodologia sensível e rápida, que avalia a viabilidade celular por meio da redução do MTT pelas desidrogenases nas mitocôndrias celulares, medindo a atividade metabólica das células (Chiba *et al.*, 1998).

Para a substância isolada samarangenina B, foi encontrado um valor de CC₅₀ de 45 ± 5,77 µg/mL através do método MTT, o que corresponde a 49 µM. O trabalho de Kuo e colaboradores (2002), ao analisar a mesma substância isolada de *L. sinense* diz que as células Vero tratadas com 25, 50 e 100 µM da substância não apresentaram inviabilidade pelo método de azul de Trypan, e com 200 µM não apresentaram citotoxicidade pelo método lactato desidrogenase (LDH). O azul de Trypan é um corante vital, que só penetra em células mortas, cujas membranas não podem mais excluí-lo (Walum *et al.*, 1990) e o método LDH é um ensaio específico para células lisadas (Korzeniewski e Callewaert, 1983). Não se devem comparar os resultados obtidos por metodologias diferentes, portanto, os testes de

atividade antiviral contra HSV-1 utilizando a samarangenina B serão realizados, a fim de determinar o IC_{50} e o índice de seletividade.

A substância epigallocatequina-3-O-galato apresentou CC_{50} de $66,67 \pm 15,28 \mu\text{g/mL}$ pelo método de MTT, correspondendo a $144 \mu\text{M}$. Estudos por meio do método de MTT demonstraram resultados dessa substância, isolada da planta *Rumex acetosa*, em valores em torno de $CC_{50} = 55 \mu\text{M}$ (Gescher *et al.*, 2011). Podendo então dizer que a substância isolada de *L. brasiliense* pode não ser tóxica às células quando comparados os estudos.

Os resultados de samarangenina A demonstraram valores de CC_{50} de $33 \pm 7 \mu\text{g/mL}$, que corresponde a $43 \mu\text{M}$. Não há estudos que tenham testado a citotoxicidade dessa substância em células Vero utilizando a metodologia descrita, mas podem-se comparar os resultados com os de substâncias da mesma classe, como a utilizada nesse trabalho samarangenina B. Quando se comparam os resultados da samarangenina A com os da samarangenina B, que foi de $49 \mu\text{M}$ pela mesma metodologia (MTT), pode-se dizer que a citotoxicidade da samarangenina A foi baixa, sendo um bom resultado para dar continuidade no estudo.

A FAE apresentou CC_{50} de $41,67 \pm 12,58 \mu\text{g/mL}$, aproximadamente a metade do valor de CC_{50} do EB ($85 \pm 5 \mu\text{g/mL}$). Isso se deve à concentração de compostos fenólicos ser muito maior na fração semipurificada que no EB, e por isso espera-se que a toxicidade celular seja um pouco mais alta. O mesmo pode-se dizer da FLB7, que é uma subfração que contém as 3 substâncias isoladas reunidas (epigallocatequina-3-O-galato, samarangenina A e samarangenina B).

Para a FAQ, resultados de CC_{50} de $56,67 \pm 11,55 \mu\text{g/mL}$ foram encontrados. A FAQ é uma fração semipurificada que contém altas concentrações de compostos de polaridade alta e grande peso molecular. É esperado que a citotoxicidade seja menor que na FAE, porém não se espera uma grande atividade antiviral dessa fração.

6.3.2 Ensaio de atividade antiviral contra Herpes simplex vírus tipo I

Os ensaios de atividade antiviral contra HSV-1 foram realizados com as mesmas amostras utilizadas nos testes de citotoxicidade. Os resultados encontram-se na tabela 6 (p. 44).

Tabela 5 - Ensaio anti HSV-1 (KOS) de extrato, frações e isolados de *Limonium brasiliense* em células Vero.

Amostra	EC ₅₀ (µg/ml) ± DP	IS
Extrato bruto	9,33 ± 0,70	9
Fração aquosa	>50	<1
Fração acetato de etila	2,50 ± 0,17	17
FLB7	2,47 ± 0,25	18
Epigallocatequina-3-O-galato	4,97 ± 0,21	13
Samarangenina A	4,03 ± 0,21	8
Samarangenina B	3,20 ± 1,04	14

EC₅₀ = Concentração que inibiu 50% a replicação viral

IS = Índice de Seletividade

Número de experimentos independentes: 03

De acordo com os resultados mostrados na tabela 5, com exceção da fração aquosa, todas as amostras apresentaram atividade antiviral contra a cepa KOS de HSV-1 e o cálculo do IS foi realizado pela razão $\frac{CC_{50}}{EC_{50}}$. O IS refere-se à média entre a concentração máxima que causa 50% da inibição do crescimento das células normais (CC₅₀) e a concentração mínima de droga que inibe 50% do vírus (EC₅₀).

Estudos demonstraram a atividade antiviral e baixa citotoxicidade do extrato etanólico de *L. brasiliense* contra HSV-1 (Faral-Tello *et al.*, 2012), porém ainda há muitas dúvidas quanto às substâncias responsáveis pela atividade e qual o mecanismo de ação da planta. Desta forma, os estudos das frações, subfrações e compostos isolados vêm a contribuir com o entendimento da atividade de *L. brasiliense* contra HSV-1.

Nos resultados obtidos por (Faral-Tello *et al.*, 2012), foi encontrado um valor de EC₅₀ de 185 µg/mL com IS de 4,58 para o extrato bruto hidro-etanólico de *L. brasiliense*, que é um valor maior que o encontrado neste trabalho, que foi de 9,33 ± 0,70 µg/mL e IS de 9 para o extrato bruto hidro-acetônico. Uma razão para a diferença de valores seria o líquido extrator utilizado na produção do extrato. Em um estudo realizado por Blainski (2017), ao realizar a produção de extratos com água, metanol, acetona e etanol, pôde-se observar que o extrato produzido com a acetona possuía maior quantidade de polifenóis totais (37,5%), enquanto que o extrato aquoso possuía um teor de 18,9%, o metanólico de 25,8% e o etanólico 25,9%.

Outra razão para os valores diferentes seria a metodologia de análise utilizada. Neste trabalho, a avaliação da atividade antiviral foi realizada pelo método de MTT, enquanto que no trabalho de (Faral-Tello *et al.*, 2012) a metodologia utilizada foi Redução de Placa de Lise (RPL). Entretanto, as duas metodologias apresentam resultados confiáveis. O teste de RPL é baseado na habilidade das partículas infecciosas virais em causar uma área macroscópica de efeito citopático em uma monocamada celular normal e, após um determinado período de tempo, a região onde ocorreu a infecção viral forma a chamada placa de lise (Fields, 2006). O ensaio de placa é um dos métodos mais confiáveis para determinação da eficácia das amostras em reduzir a formação de placas pelas partículas virais, porém, a formação de placas muito pequenas podem dificultar a contagem (Takeuchi *et al.*, 1991).

Pela primeira vez foram testadas as frações semipurificadas de *L. brasiliense* contra HSV-1. O resultado obtido para a FAQ foi um $EC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ e $IS < 1$. Como já citado neste trabalho, a FAQ é uma fração com altas concentrações de compostos de polaridade elevada e alto peso molecular. Esses compostos não possuem atividade contra HSV-1.

A FAE possui uma atividade anti-HSV-1 superior a do EB, com EC_{50} igual a $2,50 \pm 0,17 \mu\text{g/mL}$, devido à grande concentração de compostos fenólicos nessa fração, o mesmo motivo que faz ter uma citotoxicidade um pouco maior também. Porém, ao realizar o cálculo de IS, obteve-se um índice de 17, mostrando que a fração é muito mais seletiva para as células infectadas que para as sadias.

Ao realizar um fracionamento da FAE por coluna contendo Sephadex LH20, foi obtida a FLB7, que é uma subfração que contém epigallocatequina-3-O-galato, samarangenina A e samarangenina B, que são as três substâncias majoritárias da FAE. O valor de EC_{50} foi de $2,47 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$ e IS 18, valores muito próximos aos obtidos com as análises da FAE, podendo sugerir que as substâncias responsáveis pela atividade anti-HSV-1 no *L. brasiliense* são esses três taninos condensados.

A fim de determinar a atividade antiviral de cada composto, foram testados separadamente os compostos presentes na FLB7, obtendo resultados para a epigallocatequina-3-O-galato, samarangenina A e samarangenina B.

A substância epigallocatequina-3-O-galato apresentou EC_{50} de $4,97 \pm 4,36 \mu\text{g/mL}$ (que corresponde a aproximadamente $10 \mu\text{M}$) e IS 13. No estudo realizado por Gescher *et al.* (2011), a mesma substância isolada de *Rumex acetosa* e testada pelo método RPL modificado apresentou atividade antiviral em torno de $20 \mu\text{M}$.

Os resultados da samarangenina A demonstraram valores de EC_{50} de $4,03 \pm 0,21$ $\mu\text{g/mL}$ (que corresponde a $5 \mu\text{M}$) e IS 8. Ainda não existem estudos sobre atividade antiviral deste composto, porém ao comparar com os resultados das outras duas substâncias isoladas, pode-se dizer que o composto possui uma boa atividade contra HSV-1.

Para a samarangenina B, foi obtido valor de EC_{50} de $3,20 \pm 1,04$ $\mu\text{g/mL}$ (aproximadamente $3 \mu\text{M}$) e IS 14. No estudo realizado por Kuo e colaboradores (2002) a atividade anti-HSV-1 da samarangenina B foi testada pelo método de redução de placa e leitura feita com cristal violeta, obtendo um valor de EC_{50} de $12,5 \mu\text{M}$. O resultado obtido neste trabalho foi melhor que no trabalho de Kuo, provavelmente devido à metodologia diferente para realização do experimento e leitura das placas.

Para todos os testes antivirais, os valores de EC_{50} devem ser inferiores a $100 \mu\text{g/mL}$ para extratos e abaixo de $25 \mu\text{M}$ para compostos puros (Cos *et al.*, 2006), mostrando que todas as amostras testadas, com exceção da FAQ, apresentaram resultados satisfatórios de inibição da replicação do HSV-1.

7 CONCLUSÃO

As plantas do gênero *Limonium* são ricas em compostos fenólicos, especialmente galo e epigallocatequina e seus derivados. Neste trabalho, foi possível elucidar as substâncias epigallocatequina-3-O-galato, samarangenina A e samarangenina B, sendo necessários para essas duas últimas, testes pra comprovar a posição de cada ligação (COSY, HSQC, HMBC, ^{13}C , HETCOR e NOE) que serão realizados em breve.

Quando se comparam diferentes gêneros, espécies, extratos, metodologias e sistemas biológicos empregados em análises de atividade antiviral realizadas por diferentes autores, pode-se dizer que todos esses fatores têm influência no EC_{50} e IS alcançado. Deve-se considerar também que o local, período da coleta, parte da planta explorada e tipo de extrato produzido interferem no tipo, quantidade e seleção de metabólitos secundários.

Visto que atualmente não existem vacinas para prevenção de HSV-1 e que não existem muitas opções para tratamento aprovadas, as análises da atividade antiviral do extrato, frações e compostos isolados se mostraram importantes na busca de novos compostos capazes de eliminar o vírus HSV-1, demonstrando a atividade antiviral desta espécie, sendo também uma alternativa ao tratamento de cepas resistentes, bem como para auxiliar o tratamento de indivíduos imunossuprimidos.

REFERÊNCIAS

- AMRANI, A. et al. Protective role of Limonium bonduelli extract against non-enzymatic peroxidation in brain and testes induced by iron in vitro. **International Journal of Phytomedicine**, v. 9, n. 1, p. 72, 2017. ISSN 0975-0185.
- ANIYA, Y. et al. Free radical scavenging action of the medicinal herb Limonium wrightii from the Okinawa islands. **Phytomedicine**, v. 9, n. 3, p. 239-244, 2002. ISSN 09447113.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M. et al. Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of Limonium brasiliense in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 174, p. 293-298, 2015. ISSN 0378-8741.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M. et al. Morpho-anatomical study of rhizome of Limonium brasiliense. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 320-327, 2015. ISSN 0102-695X.
- BAE, M.-J. et al. Inhibition of MMP-2 and MMP-9 activities by Limonium tetragonum extract. **Preventive nutrition and food science**, v. 21, n. 1, p. 38, 2016.
- BLAINSKI, A. Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade in vivo de Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (plumbaginaceae) – Baicuru. **Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**, 2010.
- BLAINSKI, A. et al. Antibacterial activity of Limonium brasiliense (Baicuru) against multidrug-resistant bacteria using a statistical mixture design. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 313-323, Feb 23 2017. ISSN 1872-7573 (Electronic) 0378-8741 (Linking).
- BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from Limonium brasiliense L. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6852-65, Jun 10 2013. ISSN 1420-3049 (Electronic) 1420-3049 (Linking).
- BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from Limonium Brasiliense L. **Molecules**, v. 18, n. 6, p. 6852-6865, 2013.
- CAMARGO FILHO, I. et al. Antiviral activity and mode of action of a peptide isolated from Sorghum bicolor. **Phytomedicine**, v. 15, n. 3, p. 202-208, 2008. ISSN 09447113.
- CANDOLLE, A. L. P. P. **Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis sive enumeratio contracta ordinum, generum specierumque plantarum huc usque cognitarum, juxta methodi naturalis normas digesta.** sumptibus sociorum Treuttel et Würtz, 1864.
- CARDOSO, M. L. Limonium brasiliensis (boiss.) kuntze, plumbaginaceae (baicuru): desenvolvimento galênico e extratos. 1990.
- CHIANG, L.-C. et al. Immunomodulatory Activities of Flavonoids, Monoterpenoids, Triterpenoids, Iridoid Glycosides and Phenolic Compounds of Plantago Species. **Planta Medica**, v. 69, n. 07, p. 600-604, 04.08.2003 2003. ISSN 0032-0943.

CHIBA, K.; KAWAKAMI, K.; TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicology in vitro**, v. 12, n. 3, p. 251-258, 1998. ISSN 0887-2333.

CORREA, M.; PENNA, L. D. A. Dicionario das plantas uteis do Brasil e das exoticas cultivadas: volume 5. MR. **Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal 687p.-illus.. Por Icones. Geog**, v. 4, 1974.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006. ISSN 0378-8741.

DE MELLO, J. P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 807-813, 1996. ISSN 0031-9422.

DE OLIVEIRA, A. et al. Inhibition of Herpes Simplex Virus type 1 with the modified green tea polyphenol palmitoyl-epigallocatechin gallate. **Food Chemical Toxicology**, v. 52, p. 207-215, 2013. ISSN 0278-6915 1873-6351. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3703635/> >.

DE OLIVEIRA CALEARE, A. et al. Flavan-3-ols and proanthocyanidins from *Limonium brasiliense* inhibit the adhesion of *Porphyromonas gingivalis* to epithelial host cells by interaction with gingipains. **Fitoterapia**, v. 118, p. 87-93, Apr 2017. ISSN 1873-6971 (Electronic) 0367-326X (Linking).

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986. ISSN 0022-1759.

DER PFLANZENFAMILIEN, A. E. S. **Gebruder Borntraeger**: Berlin 1964.

DIAS DA SILVA, R. Plantas medicinaes do Brasil, o guaycuru. **Bol. Assoc. Bras. Pharm**, v. 1, p. 4-14, 1920.

EREN, Y.; ÖZATA, A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 1, p. 51-59, 2014. ISSN 0102695X.

ESQUENAZI, D. et al. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 647-52, Dec 2002. ISSN 0923-2508 (Print) 0923-2508 (Linking).

FARAG, R. et al. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. **Journal of food protection**, v. 52, n. 9, p. 665-667, 1989. ISSN 0362-028X.

FARAL-TELLO, P. et al. Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.

GENG, D. et al. Antioxidants screening in *Limonium aureum* by optimized on-line HPLC-DPPH assay. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 492-497, 2015. ISSN 0926-6690.

GESCHER, K. et al. Oligomeric proanthocyanidins from *Rumex acetosa* L. inhibit the attachment of herpes simplex virus type-1. **Antiviral research**, v. 89, n. 1, p. 9-18, 2011. ISSN 0166-3542.

GYAWALI, R.; IBRAHIM, S. A. Natural products as antimicrobial agents. **Food Control**, v. 46, p. 412-429, 2014. ISSN 09567135.

HAGERMAN, A. E.; BUTLER, L. G. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. **Journal of Chemical Ecology**, v. 15, n. 6, p. 1795-1810, 1989. ISSN 0098-0331.

HASLAM, E. Polyphenol-protein interactions. **Biochemical Journal**, v. 139, n. 1, p. 285, 1974.

HASSAN, S. T. S.; MASARČÍKOVÁ, R.; BERCHOVÁ, K. Bioactive natural products with anti-herpes simplex virus properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 67, n. 10, p. 1325-1336, 2015. ISSN 00223573.

HONG, W. et al. Inhibitory activity and mechanism of two scorpion venom peptides against herpes simplex virus type 1. **Antiviral research**, v. 102, p. 1-10, 2014. ISSN 0166-3542.

HSU, W.-C. et al. Limonium sinense and gallic acid suppress hepatitis C virus infection by blocking early viral entry. **Antiviral Research**, v. 118, p. 139-147, 2015. ISSN 01663542.

JAHNS, R.; CRESCENTE, A. Ensaios farmacológicos e clínicos com a associação do extrato fluído de Limonium statice brasiliense Boiss, e N-acetil-p-aminofenol em musculatura lisa. **Trib. Farm. Curitiba**, v. 44, n. 1-2, p. 105-111, 1976.

JENIS, J. et al. Phytochemical profile and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of Limonium michelsonii Lincz. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, n. 4, p. 650-658, 2017. ISSN 1340-3443 1861-0293.

JOLY, A. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 777 p: Editora Companhia Editora Nacional. Brasil 2005.

KERKATOU, M. et al. Secondary metabolites and antioxidant activity of Limonium duriusculum (de Girard) Kuntze extracts. **Asian Journal of Chemistry**, v. 28, n. 12, p. 2695, 2016. ISSN 0970-7077.

KIM, N.-H. et al. Protective Effects of Ethyl Acetate Soluble Fraction of Limonium tetragonum on Diethylnitrosamine-Induced Liver Fibrosis in Rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 6, p. 1022-1028, 2016. ISSN 0918-6158.

KOPP, S. J. et al. Herpes simplex virus serotype and entry receptor availability alter CNS disease in a mouse model of neonatal HSV. **Pediatric Research**, v. 76, n. 6, p. 528, 2014.

KORUL'KINA, L. et al. Biologically active compounds from Limonium gmelinii and L. popovii I. **Chemistry of natural compounds**, v. 40, n. 5, p. 465-471, 2004. ISSN 0009-3130.

KORZENIEWSKI, C.; CALLEWAERT, D. M. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 64, n. 3, p. 313-320, 1983/11/25/ 1983. ISSN 0022-1759. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983904386>>.

KUNITAKE, H.; KOREEDA, K.; MII, M. Morphological and cytological characteristics of protoplast-derived plants of statice (Limonium perezii Hubbard). **Scientia horticulturae**, v. 60, n. 3-4, p. 305-312, 1995. ISSN 0304-4238.

KUO, Y. C. et al. Samarangenin B from Limonium sinense Suppresses Herpes Simplex Virus Type 1 Replication in Vero Cells by Regulation of Viral Macromolecular Synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 2854-2864, 2002. ISSN 0066-4804 1098-6596.

KUROKAWA, M. et al. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* in vitro and in vivo. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, n. 1, p. 72-8, Apr 1999. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565 (Linking).

KWON, M. S. et al. Adipogenesis inhibitory effects of *Limonium tetragonum* in mouse bone marrow stromal D1 cells. **Food Science and Biotechnology**, v. 25, n. S1, p. 125-131, 2016. ISSN 1226-7708 2092-6456.

LAI, P.; ROY, J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. **Current medicinal chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1451-1460, 2004. ISSN 0929-8673.

LAVOIE, S. et al. Chemical composition and anti-herpes simplex virus type 1 (HSV-1) activity of extracts from *Cornus canadensis*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, 2017. ISSN 1472-6882.

LEFAHAL, M. et al. Chemical composition of *Limonium thouinii* (viv.) kuntze (Plumbaginaceae) and the DPPH free radical scavenging activity. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 48, n. 3, p. 476-479, 2016. ISSN 0324-1130.

LIFCHITZ, A. **Plantas medicinales: guía práctica de botánica medicinal**. Ediciones Arneo, 1981.

LIN, L.-C.; KUO, Y.-C.; CHOU, C.-J. Anti-herpes simplex virus type-1 flavonoids and a new flavanone from the root of *Limonium sinense*. **Planta Medica**, v. 66, n. 04, p. 333-336, 2000. ISSN 0032-0943.

LIPUN, V. et al. Efficacy of Thai medicinal plant extracts against herpes simplex virus type 1 infection in vitro and in vivo. **Antiviral research**, v. 60, n. 3, p. 175-180, 2003. ISSN 0166-3542.

The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=limonium>. 2013. Acesso em: Outubro 19, 2017.

LIU, Y. et al. Flavonoids and phenolics from the flowers of *limonium aureum*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 52, n. 1, p. 130-131, 2016. ISSN 0009-3130.

LOPES, M.; STUMPF, E.; CARVALHO, F. Efeito do substrato na reprodução assexuada da *Limonium brasiliense* (Boiss.) O. Kuntze. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 9, n. 4, 2003. ISSN 2317-2436.

MARKHAM, A.; FAULDS, D. Ganciclovir. An update of its therapeutic use in cytomegalovirus infection. **Drugs**, v. 48, n. 3, p. 455-84, Sep 1994. ISSN 0012-6667 (Print) 0012-6667 (Linking).

MEDINA, J.; RONDINA, R.; COUSSIO, J. PHYTOCHEMICAL Screening of argentine plants with potential pharmacological activity (Part VII) 1. **Planta medica**, v. 31, n. 02, p. 136-140, 1977. ISSN 0032-0943.

MEDINI, F. et al. Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte *Limonium densiflorum* extracts on human cell lines and murine macrophages. **South African Journal of Botany**, v. 99, p. 158-164, 2015. ISSN 02546299.

MEDINI, F. et al. Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. **Journal of Taibah University for Science**, v. 8, n. 3, p. 216-224, 2014. ISSN 16583655.

MEDINI, F. et al. Antiviral efficacy of *Limonium densiflorum* against HSV-1 and influenza viruses. **South African journal of botany**, v. 92, p. 65-72, 2014. ISSN 0254-6299.

MEDINI, F. et al. Antiviral-guided fractionation and isolation of phenolic compounds from *Limonium densiflorum* hydroalcoholic extract. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, n. 6, p. 726-732, 2016. ISSN 16310748.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. ISSN 0022-1759.

MOURA, T. et al. Estudos farmacológicos preliminares das raízes do *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze-Plumbaginaceae (Baicuru). **Caderno de Farmácia**, v. 1, p. 45-54, 1985.

MOVSUMOV, I.; GARAEV, E. Flavonoids from *Limonium meyeri*. **Chemistry of natural compounds**, v. 41, n. 3, p. 348-348, 2005. ISSN 0009-3130.

MURRAY, A. P. et al. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 59, n. 7-8, p. 477-80, Jul-Aug 2004. ISSN 0939-5075 (Print) 0341-0382 (Linking).

NOCCHI, S. et al. Antiviral Activity of Crude Hydroethanolic Extract from *Schinus terebinthifolia* against Herpes simplex Virus Type 1. **Planta Medica**, v. 83, n. 06, p. 509-518, 2016. ISSN 0032-0943 1439-0221.

NONAKA, G.-I. et al. Tannins and related compounds. CXIX. Samarangenins a and b, novel proanthocyanidins with doubly bonded structures, from *Syzygium samarangens* and *S. aqueum*. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 40, n. 10, p. 2671-2673, 1992. ISSN 0009-2363.

PAULA PIFARRÉ, M. A. et al. Therapeutic Action of Meliacine, a Plant-derived Antiviral, on HSV-induced Ocular Disease in Mice. **Experimental Eye Research**, v. 75, n. 3, p. 327-334, 2002/09/01/ 2002. ISSN 0014-4835.

PEI, Y. et al. Notoginsenoside ST-4 inhibits virus penetration of herpes simplex virus *in vitro*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, n. 06, p. 498-504, 25 May 2011 2011. ISSN 06.

RAGONESE, A. E.; MILANO, V. A. **Vegetales y sustancias tóxicas de la flora argentina**. Acme Buenos Aires, 1984.

RODRIGUES, M. J. et al. In vitro antioxidant and anti-inflammatory properties of *Limonium algarvense* flowers' infusions and decoctions: A comparison with green tea (*Camellia sinensis*). **Food Chemistry**, v. 200, p. 322-329, 2016. ISSN 0308-8146.

RODRIGUEZ, S. et al. Antiinflammatory activity from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. **Planta Medica**, v. 77, n. 12, p. PF68, 2011. ISSN 0032-0943.

ROSITO, J. F. Contribuição à análise das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.). **Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Curso de Pós-Graduação em Farmácia**, 1975.

ROSS, S. Myricetin-3'-methyl Ether-7-glucoside from *Limonium sinuatum*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 5, p. 862-864, 1984. ISSN 0163-3864.

SAGAR, S.; KAUR, M.; MINNEMAN, K. P. Antiviral lead compounds from marine sponges. **Marine drugs**, v. 8, n. 10, p. 2619-2638, 2010.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.; PELL, A. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal feed science and technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001. ISSN 0377-8401.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016. ISBN 8582713657.

SUDO, K. et al. A sensitive assay system screening antiviral compounds against herpes simplex virus type 1 and type 2. **Journal of virological methods**, v. 49, n. 2, p. 169-178, 1994. ISSN 0166-0934.

TAKEUCHI, H.; BABA, M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of virological methods**, v. 33, n. 1-2, p. 61-71, 1991. ISSN 0166-0934.

TANG, X.-H. et al. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the root of *Limonium sinense* Kuntze. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1134-1139, 2012. ISSN 01418130.

TANG, X. et al. Expression of VDAC regulated by extracts of *Limonium sinense* Ktze root against CCl₄-induced liver damage. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, n. 3, p. 204-213, 2007.

TRABELSI, N. et al. Isolation of powerful antioxidants from the medicinal halophyte *Limoniastrum guyonianum*. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1419-1424, 2012. ISSN 03088146.

TRABELSI, N. et al. The antioxidant properties of new dimer and two monomers of phenolic acid amides isolated from *Limoniastrum guyonianum*. **Food Chemistry**, v. 146, p. 466-471, 2014. ISSN 03088146.

TRINDADE, A. K. F. D. et al. Herpes Simples Labial um desafio terapêutico. **Comun. ciênc. saúde**, v. 18, n. 4, p. 307-313, 2007. ISSN 1980-0584.

UEDA, K. et al. Inactivation of pathogenic viruses by plant-derived tannins: strong effects of extracts from persimmon (*Diospyros kaki*) on a broad range of viruses. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55343, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking).

VILHELMOVA-ILIEVA, N. et al. Ellagitannins as synergists of ACV on the replication of ACV-resistant strains of HSV 1 and 2. **Antiviral Research**, v. 110, p. 104-114, 2014. ISSN 01663542.

VILLARREAL, E. C. Current and potential therapies for the treatment of herpesvirus infections. In: (Ed.). **Progress in drug research**: Springer, 2003. p.263-307.

W. JOHN KRESS, L. B. A. O. Caryophyllales. **Encyclopaedia Britannica, inc.**, 2008. Disponível em: < <https://www.britannica.com/plant/Caryophyllales> >. Acesso em: Outubro 19, 2017.

WALUM, E.; STENBERG, K.; JENSSEN, D. **Understanding cell toxicology**. E. Horwood, 1990. ISBN 0745802672.

WATANABE, D. Medical application of herpes simplex virus. **Journal of dermatological science**, v. 57, n. 2, p. 75-82, 2010. ISSN 0923-1811.

WHITE, D.; FENNER, F. Herpesviridae. **Medical Virology, 4th Edition (eds DO White and FJ Fenner)**, p. 317-47, 1994.

WHITING, P. et al. Phytoecdysteroids in the genus *Limonium* (Plumbaginaceae). **Biochemical systematics and ecology**, v. 26, n. 6, p. 695-698, 1998. ISSN 0305-1978.

WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. **The lancet**, v. 357, n. 9267, p. 1513-1518, 2001. ISSN 0140-6736.

XU, D.-P. et al. Ultrasound-assisted extraction of natural antioxidants from the flower of *Limonium sinuatum*: Optimization and comparison with conventional methods. **Food Chemistry**, v. 217, p. 552-559, 2017. ISSN 0308-8146.

XU, H.-X. et al. Isolation and characterization of an anti-HSV polysaccharide from *Prunella vulgaris*. **Antiviral Research**, v. 44, n. 1, p. 43-54, 1999/11/01/ 1999. ISSN 0166-3542. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166354299000534> >.

XUE, J.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 51, p. 12720-12726, 2013. ISSN 0021-8561.

YARMOLINSKY, L. et al. Potent antiviral flavone glycosides from *Ficus benjamina* leaves. **Fitoterapia**, v. 83, n. 2, p. 362-7, Mar 2012. ISSN 1873-6971 (Electronic) 0367-326X (Linking).

YE, G.; HUANG, C. Flavonoids of *Limonium aureum*. **Chemistry of natural compounds**, v. 42, n. 2, p. 232-234, 2006. ISSN 0009-3130.

ZANDI, K. et al. Evaluation of antiviral activities of curcumin derivatives against HSV-1 in Vero cell line. **Natural Products Communications**, v. 5, n. 12, p. 1935-1938, 2010/12// 2010. ISSN 1934-578X. Disponível em: < <http://europepmc.org/abstract/MED/21299124> >.

ZAPPI, D. Plumbaginaceae. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, 2015. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB192> >. Acesso em: Outubro 19, 2017.

ZHANG, L.-R.; ZOU, G.-L. Flavanol of *Limonium bicolor*. **Chemistry of natural compounds**, v. 40, n. 6, p. 602-603, 2004. ISSN 0009-3130.

ZHUSUPOVA, G.; ABIL'KAEVA, S. Dimeric prodelphinidins from *Limonium gmelinii* roots. III. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 42, n. 2, p. 164-168, 2006a. ISSN 0009-3130.

_____. Flavanes from *Limonium gmelinii*. II. **Chemistry of natural compounds**, v. 42, n. 1, p. 112-113, 2006b. ISSN 0009-3130.