



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS



**Controle de Qualidade Farmacognóstico com Análise Cromatográfica
Quantitativa, Planejamento Estatístico de Misturas com Avaliação
Antibacteriana e Estudos Fitoquímicos de *Limonium brasiliense*
(Baicuru)**

ANDRESSA BLAINSKI PINHA

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

Maringá

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**Controle de Qualidade Farmacognóstico com Análise Cromatográfica
Quantitativa, Planejamento Estatístico de Misturas com Avaliação
Antibacteriana e Estudos Fitoquímicos de *Limonium brasiliense*
(Baicuru)**

ANDRESSA BLAINSKI PINHA

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello

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

MARINGÁ

2016

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

B634c Blainski-Pinha, Andressa
Controle de qualidade farmacognóstico com análise cromatográfica quantitativa, planejamento estatístico de misturas com avaliação antibacteriana e estudos fitoquímicos de *Limonium brasiliense* (Baicuru) / Andressa Blainski Pinha -- Maringá, 2016.
152 f. : il., color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2016.

1. *Limonium brasiliense*. 2. CLAE/UV-Vis. 3. Centróide simplex. 4. Bactérias multi-resistentes. 5. RMN de taninos. 6. Controle farmacognóstico. 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. III. Título.

CDD 21.ed. 615.1

AHS

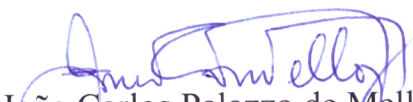
ANDRESSA BLAINSKI PINHA

**CONTROLE DE QUALIDADE FARMACOGNÓSTICO COM ANÁLISE
CROMATOGRÁFICA QUANTITATIVA, PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO
DE MISTURAS COM AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA E ESTUDO
FITOQUÍMICO DE *Limonium brasiliense* (BAICURU).**


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

Aprovada em 20 de outubro de 2016


BANCA EXAMINADORA


João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá


Andreas Hensel
Westfälische-Wilhelms Universität zu Münster


Denise Brentan da Silva
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul


Galdino Andrade Filho
Universidade Estadual de Londrina


Mara Lane Carvalho Cardoso
Universidade Estadual de Maringá

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial ao meu marido, Ítalo do Lago Pinha, por me incentivar sempre a buscar novos desafios e ajudar a superá-los.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello por todos esses anos de aprendizado e formação. Por não ser apenas um orientador acadêmico (iniciação científica, mestrado e doutorado), mas também um amigo que tive a sorte de conhecer cedo e ter como modelo de dedicação e comprometimento para minha vida.

À minha família, por toda compreensão, incentivo e carinho.

À Helena por sempre me ajudar com muito carinho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação que contribuíram para minha formação.

Aos professores que contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho: Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior, Profa. Dra. Denise Brentan da Silva, Profa. Dra. Ieda Scarmínio e Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

Aos professores que compuseram a Banca de Qualificação por participarem na discussão deste trabalho: Profa. Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso e Profa. Dra. Renata Longhini. Assim como, aos professores que compõem esta Banca de Defesa: Prof. Dr. Andreas Hensel, Profa. Dra. Denise Brentan da Silva, Prof. Dr. Galdino Andrade e Profa. Dra. Mara Lane Carvalho Cardoso.

Ao Admir Arantes, técnico do Laboratório Palafito, por viabilizar sempre o nosso trabalho.

A todos os colegas do Palafito, em especial a Raquel Isolani, Leila Marques, Tânia Antonelli, Mariane Ritter, Letícia Krzyzaniak, André Oliveira, Naiara Gancedo, Bruna Aguiar e Gisely Lopes, por todas as vezes que me ajudaram, principalmente por não estar sempre presente no laboratório; cada ajuda foi preciosa!

À Rosimeri Oliveira e sua mãe, Sra. Emília, por me receberem na Ilha dos Marinheiros-RS com tanto carinho e por todo o suporte durante a coleta da planta.

Ao Aché Laboratório Farmacêutico, em especial à Cláudia Catalan, pela disponibilização do Laboratório de Desenvolvimento Analítico para a realização de grande parte deste trabalho. Agradeço também a grande ajuda dos meus antigos colegas e grandes amigos Carlos Vitor, Lisandra Pessa, Hatylas Azevedo, Paulo Pires dos Santos e Thaisa Violin.

À Finzelberg, especialmente Dr. Ralf Spreemann, e à Martin Bauer Brasil, Morten Sorensen e Eliana Bufaino, por confiarem no meu trabalho e proporcionarem grandes desafios mesmo antes da conclusão deste projeto.

Ao CNPq, CAPES, INCT_if, FINEP e Fundação Araucária, assim como ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pelos auxílios concedidos.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À Deus, por todas as coisas boas que me concede e proporciona.

BIOGRAFIA



Andressa Blainski Pinha possui graduação em Farmácia, habilitação Industrial, pela Universidade Estadual de Maringá (2007), Mestrado em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da mesma instituição (2010), e MBA em Gestão Empresarial pela Universidade Paulista (2011). Atuou no Desenvolvimento Analítico e Validação de Métodos Analíticos (2009-2011) e na área de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (2011-2014) no Aché Laboratórios Farmacêuticos. Desde 2014, trabalha na indústria alemã de extratos vegetais ativos, Finzelberg, nas áreas de Assuntos Técnicos e Desenvolvimento de Negócios. Possui formação e atuação nas áreas de farmacognosia e produtos naturais, com experiência nos seguintes temas: controle de qualidade analítico, fitoquímica de taninos, protocolos pré-clínicos de eficácia e segurança, acompanhamento de estudos clínicos, desenvolvimento de matérias primas de origem vegetal e produtos fitoterápicos, estudos de estabilidade, assim como em prospecção e gerenciamento de projetos fitoterápicos. Desde 2012 realiza o Doutorado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual de Maringá.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Farmacêutica - Palafito (Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello), e empregando também equipamentos do Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa (Comcap), da Universidade Estadual de Maringá; no Laboratório Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS – Química Orgânica) (Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes) da Universidade de São Paulo Câmpus de Ribeirão Preto; no Laboratório de Ecologia Microbiana (Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior) da Universidade Estadual de Londrina; assim como no Laboratório de Desenvolvimento Analítico (Gerente Cláudia Catalan) do Aché Laboratório Farmacêutico, Laboratório de Cromatografia em Camada Delgada (Gerente Dr. Hermann Kurth) da Finzelberg e, também contou com a colaboração da Profa. Dra. Ieda S. Scarminio do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina e Profa. Dra. Denise Brentan Silva da Universidade de Mato Grosso do Sul. Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Inovação Farmacêutica (INCT_if), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e à Fundação Araucária.

Partes deste trabalho foram apresentadas em Congressos:

BLAINSKI, A.; ANTONELLI-USHIROBIRA, TM; ISOLANI, R.G.; GABURO, F.; LOPES, G.C.; AGUIAR, B.A.A.; LEITE-MELLO, E.V.S.; MELLO, J.C.P. Determination of gallicocatechin and epigallocatechin by high performance liquid chromatography of the roots of *Limonium brasiliense*. In: 14th International Congress of Ethnopharmacology, Puerto Varas, Chile, 23 a 26 de setembro de 2014.

BLAINSKI, A.; LEITE-MELLO, E.V.S.; SCARMINIO, I.S.; MELLO, J.C.P. Statistical mixture design selective extraction of total polyphenol, gallicocatechin and epigallocatechin content from *Limonium brasiliense* extracts. In: CIPAM 2016 - 6th International Congress of Aromatic and Medicinal Plants, Coimbra Portugal, 29 de maio a 1 de junho de 2016.

BLAINSKI, A.; GIONCO, B.; ISOLANI, R.G.; OLIVEIRA, A.G.; ANDRADE, G.; MELLO, J.C.P. Descoberta de novas atividades de *Limonium brasiliense* por planejamento estatístico de misturas: antimicrobiano contra bactérias multirresistentes. In: XXIV Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Belo Horizonte, Brasil, 21 a 24 de setembro de 2016.

RESUMO

BLAINSKI, A. 2016. Controle de Qualidade Farmacognóstico com Análise Cromatográfica Quantitativa, Planejamento Estatístico de Misturas com Avaliação Antibacteriana e Estudos Fitoquímicos de *Limonium brasiliense* (Baicuru). Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá.

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae), conhecida como baicuru, é uma planta nativa do litoral sul do Brasil e da região do rio da Prata. Seus rizomas são empregados principalmente no tratamento de tensão pré-menstrual, distúrbios menstruais e infecções geniturinário. Estudos prévios reportam a presença de substâncias fenólicas, taninos e flavonoides, em grande concentração no gênero *Limonium*. Os últimos trabalhos revelam efeito do tipo antiestrogênico em ratas Wistar imaturas e baixa toxicidade em modelos de estudos não clínicos (*in vivo* em ratos Wistar). Pelo presente trabalho, dados de controle de qualidade farmacognóstico de três diferentes coletas foram comparados a fim de colaborar com a determinação de parâmetros de qualidade mínimos para esta espécie. Foram analisados parâmetros farmacopeicos e não farmacopeicos, tais como: granulometria dos pós ($d_{50}=0,21$ a $0,48$ mm), perda por dessecação (11,1% a 12,4%), cinzas totais (4,9% a 5,7%), resíduo seco por extração com acetona:água (7:3, v/v) (30,6% a 39,5%), teor de polifenóis totais (8,5% a 15,8%) e perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O extrato bruto, assim como as frações acetato de etila e aquosa demonstraram potencial antioxidante ($IC_{50} = 6,87, 5,91$ e $6,92$ $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). O perfil cromatográfico foi obtido por cromatografia em camada delgada, assim como por CLAE a partir de método desenvolvido e validado para a separação de polifenóis e quantificação de galocatequina (GC) e epigalocatequina (EGC) na fração acetato de etila. Os dados mostraram que o método analítico é específico, preciso e exato. O planejamento estatístico de misturas (centroide simplex) para avaliar a influência dos solventes de extração (água, metanol, acetona e etanol) demonstrou, considerando os dados do experimento confirmatório realizado com extração acetona água (7:3, v/v), que modelos estatísticos podem ser utilizados para prever a quantidade de polifenóis totais e GC de qualquer mistura desses quatro solventes. Entretanto, para resíduo seco, não foi possível determinar um modelo preditivo mesmo após avaliação do modelo cúbico completo e, para EGC, os dados mostram maior seletividade (cerca de 20 vezes) da água para fenóis de menor massa molecular. Os resultados demonstram uma variedade de respostas: o maior teor de resíduo seco foi para a mistura ternária água:acetona:etanol ($36,6\% \pm 0,96$ [2,6%]); para teor de polifenóis totais foi a mistura primária acetona pura ($37,5\% \pm 0,46$ [1,2%]) e a água pura apresentou o maior teor de GC e EGC ($7,9\% \pm 0,39$ [5,0%] e $19,6\% \pm 0,69$ [3,5%], respectivamente). A análise de componente principal e análise de agrupamento hierárquica dos cromatogramas foram prejudicadas pelo deslocamento do tempo de retenção de alguns picos, entretanto as análises do espectro de ultravioleta de cada pico do cromatograma indica a presença homogênea de flavan-3-ols característicos de taninos. A análise por espectrometria de massas (LC-DAD-MS) confirmou a presença de ácido gálico, galocatequina, epigalocatequina, e prodelfinidinas-galato. Os extratos brutos, assim como as frações acetato de etila de cada um deles, produzidos pelo centroide simplex foram testados quanto ao potencial antibacteriano *in vitro* contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VRE_{fm}) e *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC). As frações acetato de etila apresentaram maior potencial do que os extratos brutos, em especial as obtidas a partir da mistura ternária água:acetona:etanol contra VRE_{fm} (MIC = 19 $\mu\text{g/mL}$) e a partir de metanol:acetona:etanol contra MRSA (MIC = 39 $\mu\text{g/mL}$). A atividade moderada foi notada contra KPC (MIC = 625 $\mu\text{g/mL}$) com diferentes amostras. O estudo fitoquímico possibilitou o isolamento e identificação de substâncias fenólicas, tais como miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo, miricetina-3-O- β -D-galactosídeo-6'-galato, galocatequina, epigalocatequina, epigalocatequina-3-O-galato, epigalocatequina-3-O-galato-(4 β →8)-epigalocatequina-3-O-galato e monômeros e dímeros do tipo B duplamente ligados, como epigalocatequina-3-O-(2'→O→4'')-galato, epigalocatequina-3-O-(2'→O→3'')-galato (4 β →8) epigalocatequina-3-O-galato e samarangenina B.

Palavras-chave: *Limonium brasiliense*, CLAE/UV-Vis, centroide simplex, bactérias multi-resistentes, RMN de taninos, controle farmacognóstico.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 ASPECTOS GERAIS.....	6
2.1.1 Família Plumbaginaceae.....	6
2.1.2 Gênero <i>Limonium</i>	7
2.1.3 <i>Limonium brasiliense</i> (Boiss.) Kuntze	11
2.2 ASPECTOS QUÍMICOS	14
2.2.1 Substâncias Fenólicas	14
2.2.2 Taninos	18
2.2.3 Flavonoides.....	23
2.3 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA E PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE MISTURAS	26
2.4 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS	30
2.4.1 <i>Enterococcus</i>	30
2.4.2 <i>Staphylococcus</i>	34
2.4.3 <i>Klebsiella</i>	35
2.4.4 Perspectivas de novas drogas	37
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 OBJETIVO GERAL.....	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
CAPITULO 1: Avaliação farmacognóstica, desenvolvimento e validação de método por CLAE-DAD para teor de galocatequina e epigalocatequina em rizomas de <i>L. brasiliense</i>	41
CAPITULO 2: Atividade antibacteriana de <i>L. brasiliense</i> contra bactérias multirresistentes usando planejamento estatístico de misturas	61
CAPITULO 3: Estudo fitoquímico de rizomas de <i>L. brasiliense</i>	91
4 CONCLUSÃO.....	126
5 REFERÊNCIAS	128
6 ANEXOS	148
6.1 CARTA DE ACEITE DO ARTIGO CIENTÍFICO	149
7 APÊNDICES	150
7.1 DESCRIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	151

1 INTRODUÇÃO

O estudo das plantas medicinais remonta praticamente ao princípio da evolução do homem sobre a terra. O homem pré-histórico observava o comportamento dos animais na hora de curar suas feridas ou diminuir sofrimentos. Destas observações deu-se início ao processo instintivo e empírico de caracterização de diversas plantas e seus efeitos, permitindo ao homem discernir quais delas possuíam efeitos medicinais e quais possuíam efeitos tóxicos (ALONSO, 1998). Em pesquisa recente, verificou-se evidências de que o homem-de-neandertal (existentes até cerca de 24 mil anos atrás) utilizava vegetais na prática medicinal. As análises de micro-fósseis de plantas presas na arcada dentária de cinco indivíduos provenientes do sítio arqueológico de El Sidrón, norte da Espanha, são as primeiras evidências do consumo de vegetais cozidos e uso de plantas medicinais pelos neandertais dessa região (HARDY et al., 2012).

As práticas fitoterápicas estão presentes em toda trajetória evolutiva do homem. Os gregos antigos já ordenavam as intervenções médicas em: 1° a palavra; 2° a planta e 3° a faca (HEIDE, 1996). Somente em tempos recentes, com os avanços científicos e tecnológicos, é que a utilização de produtos naturais cedeu espaço ao emprego de outras terapias, como medicamentos alopáticos, que surgiram somente após 1897, com o desenvolvimento do primeiro fármaco sintético, a aspirina (SCHMIDT, 2008). Até nas culturas mais antigas, procedeu-se à coleta metodológica e científica de informações sobre ervas medicinais para o desenvolvimento de farmacopeias. Grande parte das farmacopeias científicas deriva de tradições de povos nativos. Além disso, as farmacopeias modernas contêm pelo menos 25% de fármacos derivados de plantas e muitos outros que são análogos sintéticos de substâncias isoladas destas (FARNSWORTH et al., 1985; ASTIN, 1998).

A maioria da população dos países em desenvolvimento utiliza as plantas medicinais para satisfazer suas necessidades em saúde, sendo frequentemente empregadas em serviços primários e atendimento básico. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que cerca de 80% da população mundial utiliza primariamente plantas medicinais como recurso terapêutico. O consumo de plantas medicinais em países subdesenvolvidos, por vezes incentivado pela ausência de alternativas econômicas viáveis, é consideravelmente elevado quando comparado às sociedades industrializadas, nas quais o uso de medicamentos fitoterápicos é em torno de 30% (WHO, 1998; HANSEN et al., 2006; VEIGA-JUNIOR, 2008; STANGE, 2014).

Por outro lado, há um crescente interesse pelo desenvolvimento de fitoterápicos, neste contexto destacam-se as ações governamentais como a aprovação pelo governo brasileiro da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006) e elaboração do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que visam melhorar o acesso da população a plantas medicinais e fitoterápicos, à inclusão social e regional, ao desenvolvimento industrial e tecnológico, à promoção da segurança alimentar e nutricional e o uso sustentável da biodiversidade brasileira e da valorização e preservação do conhecimento tradicional associado (BRASIL, 2009). Além disso, no Brasil existe regulamentação específica para o registro de fitoterápicos desde 1967, pela Portaria nº 22/1967, a qual

já apresentava, embora com menor detalhamento, os aspectos essenciais exigidos quanto à qualidade, eficácia e segurança. Algumas normas sucederam essa portaria e representaram marcos regulatórios, como a RDC nº 17/2000, que introduziu o conceito do uso tradicional (NETTO et.al, 2006) e mais recentemente a publicação da RDC nº 26/2014, que distingue os fitoterápicos em duas categorias, o Medicamento Fitoterápico (MF) e o Produto Tradicional Fitoterápico (PTF), a fim de facilitar o acesso seguro e o uso racional dos Fitoterápicos pela população (CARVALHO et al., 2014).

Produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todos os ativos farmacêuticos (BALANDRIN, 1993). Além disso, o interesse crescente na indústria farmacêutica por plantas medicinais está relacionado ao fato destas representarem uma importante fonte de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em protótipos para a síntese de um grande número de fármacos (WALL; WANI, 1996; YUNES et al., 2001). Substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de fármacos tem uma importância histórica, destacando-se a *Digitalis lanata* Ehrh., *Papaver somniferum* L., *Cinchona* spp., *Atropa belladonna* L., *Physostigma venenosum* Balf., *Ephedra* spp., *Chondrodendron tomentosum* Ruiz. & Pav., *Claviceps purpúrea* (Fr.) Tul. e *Rauvolfia serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz.

A utilização de plantas medicinais no Brasil é muito difundida, mas são raras as pesquisas que avaliam seu grau de utilização. Uma pesquisa revela que, pelo menos, 63% dos entrevistados utilizam plantas medicinais como principal fonte terapêutica, certamente, pela herança cultural brasileira e pela disponibilidade de uma grande biodiversidade. Por outro lado, apenas 27% dos profissionais entrevistados da área da saúde indicariam a utilização das plantas medicinais. Esta refratariedade pode estar vinculada a falta de conhecimento sobre o assunto, ao ceticismo da comunidade médica e a ausência de testes clínicos de eficácia (VEIGA-JUNIOR, 2008). Outros países parecem ter uma melhor aceitação científica dos fitoterápicos, em especial os relacionados à tradicionalidade de uso. Na Alemanha, por exemplo, onde a fitoterapia é matéria corrente dos cursos de medicina, pesquisas mostram que 70% dos médicos prescrevem fitoterápicos (GRÜNWARD, 1995; STANGE, 2014).

A biodiversidade do Brasil possui um grande potencial de moléculas inovadoras, apresentando uma vantagem competitiva de aproximadamente 55 mil espécies vegetais catalogadas (BARATA; QUEIROZ, 1995; BRASIL, 2006), de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES et al., 1996). No entanto, esta diversidade é pouco conhecida, porém seu potencial farmacêutico permanece, uma vez que as plantas produzem uma grande variedade de substâncias químicas e ampla diversidade em termos de propriedades físico-químicas e biológicas (SIMÕES et al., 1996; WALL; WANI, 1996; REIS et al., 2007;).

Assim, uma das principais limitações relacionadas ao uso de produtos naturais como fonte de fármacos é a complexidade do processo de avaliação, pois os extratos são considerados misturas biológicas complexas e de difícil caracterização (NISBET; MOORE, 1997). Além disso, os constituintes das plantas medicinais podem variar de acordo com fatores genéticos, clima, qualidade

do solo e outros fatores externos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; SCHULZ et al., 2002). Muitas dessas desvantagens estão sendo ultrapassadas através de avanços técnicos significativos, principalmente a partir dos anos 80, como os desenvolvimentos alcançados nas técnicas cromatográficas e nas técnicas de elucidação estrutural, particularmente relacionados com a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (*MS-Mass spectrometry*) (SCHENKEL et al., 2007).

Entre as drogas vegetais da biodiversidade brasileira, os rizomas de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze são empregados popularmente como antisséptico nas infecções geniturinárias, adstringente, depurativo e, principalmente, no tratamento de cólicas menstruais e como regulador dos períodos menstruais (MOURA, 1984; CARDOSO, 1990). Acredita-se, também, serem efetivos no tratamento de hemorragia, reumatismo e, ainda, possuir propriedades cardioprotetoras (MURRAY et al., 2004). Estudos anteriores sugerem baixa toxicidade e efeito antiestrogênico em teste não-clínicos *in vivo* (BLAINSKI, 2010; ANTONELLI-USHIROBIRA, 2015). Nossos estudos mostraram que cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) assim como *Enterococcus faecium* resistente a vacromicina (VRE_{fm}) foram suscetíveis a extratos provenientes de *L. brasiliense*.

S. aureus e *E. faecium* são bactérias Gram-positivas e patógenos oportunistas que causam uma variedade de doenças. Especial importância deve ser dada a casos associados a infecções hospitalares e adquiridas na comunidade de cepas drogas-resistentes, que nas últimas décadas tem aumentado em diversos países. A meticilina e a vancomicina são antibióticos aplicados normalmente em casos de resistência a antibióticos convencionais como penicilina e amoxicilina. Entretanto, relatos de MRSA surgiram logo após seu lançamento na década de 60 e vem crescendo desde a década de 80. Já a vancomicina, é um importante antibiótico em casos de cepas drogas-resistentes usada inclusive para MRSA. Nenhum caso havia sido reportado até 1988, porém desde então os números são crescentes. Assim, a preocupação sobre bactérias resistentes aos fármacos é crescente e um problema de saúde mundial (CARDOZO et al., 2012; GELATTI et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2000; RUZON et al., 2010).

Para o desenvolvimentos de medicamentos a base de plantas vegetais, é necessário estabelecer os métodos para controle de qualidade e analíticos da matéria-prima, além de comprovações científicas da efetividade e segurança de seu uso (ANVISA, 2014). No entanto, os estudos de controle de qualidade e caracterização analítica de *L. brasiliense* são praticamente inexistentes ou superados pelos avanços tecnológicos mais recentes, sendo insuficientes para relacionar as substâncias fenólicas e os taninos aos aspectos biológicos e assegurar um padrão de qualidade. Bases científicas e tecnológicas possibilitam a produção regular e reprodutível de extratos vegetais com as mesmas características farmacêuticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS

2.1.1 Família Plumbaginaceae

Limonium brasiliense é uma espécie da família Plumbaginaceae e subfamília Staticeae. A família Plumbaginaceae compreende cerca de 2340 espécies, sendo 635 nomes de espécies aceitos e 630 consideradas sinônimas e, as demais consideradas não resolvidas ou, ainda, não aceitas. A família é dividida em 24 gêneros. Estão presentes em regiões semi-árida, litorânea e salgada, principalmente da Ásia Central e Mediterrâneo. Os gêneros estão divididos em 2 subfamílias, Plumbagineae e Staticeae. Essa divisão foi determinada por caracteres morfológicos, entretanto, parece estar coerente com a presença de compostos químicos distintos entre as subfamílias. Na subfamília Plumbagineae foi constatada a presença de naftoquinonas nas raízes, enquanto que na Staticeae estas substâncias estavam ausentes. Além disso, foi constatada uma maior prevalência de flavonoides nas folhas e flores de Staticeae e a presença de taninos, enquanto este último não foi encontrado na Plumbagineae (HARBORNE, 1967; LAWRENCE, 1951; THE PLANT LIST; 2016).

As Plumbaginaceae são plantas herbáceas, arbustivas ou subarbustivas, com folhas inteiras, alternas, sem estípulas. As flores são vistosas, de coloração azul e simetria radial. No Brasil, existe uma espécie do gênero *Plumbago*, na região Nordeste e Leste, e uma espécie do gênero *Limonium* no litoral da região Sul (JOLY, 2005).

Trabalhos relatam a presença de plumbagina, uma naftoquinona ativa contra *Helicobacter pylori*, efeito antidiabético e anti-inflamatório em *Plumbago zeylanica* L., uma planta da subdivisão Plumbagineae (HSIEH et al., 2005; LIN et al., 2003; SUNIL et al., 2012; WANG; HUANG, 2005a; WANG; HUANG, 2005b). Outras naftoquinonas, incluindo três novas estruturas de difuranocaftoquinonas, tem sido elucidadas em raízes de *P. zeylanica* (KISHORE et al., 2010). Fito-hormônios exógenos têm aumentado a produção de plumbagina em cultura de células das raízes de *Plumbago indica* L. (GANGOPADHYAY et al., 2011a; GANGOPADHYAY et al., 2011b). Trabalhos visam isolar plumbagina de *P. zeylanica* e aumentar sua absorção e disponibilidade pelo trato intestinal (BOTHIRAJA et al., 2011; BOTHIRAJA et al., 2012).

No estudo bibliográfico realizado por Paiva et al. (2003), foram levantados as comprovações científicas de diferentes espécies pertencentes a família Plumbaginaceae. Foram relacionadas diversas atividades biológicas, entre elas, atividade leishmanicida, tripanossomicida, antimalária, antiviral, antitumoral, antimicrobiana e inseticida.

Um composto de extratos de raízes vegetais, popularmente usado como contraceptivo na Índia, contendo *Plumbago rosea* L., foi administrado em ratas. Verificaram-se alterações histológicas nas estruturas do útero e ovário, tais como divergências nas células tecais e células granulosas e formação de zona pelúcida nos ovários; no útero, o epitélio endometrial sobre a superfície luminal demonstrou pseudo estratificação, vacuolação de células e descamação irregular do estroma. Os ensaios demonstraram que o ovário foi o principal sítio de ação (SARMA; MAHANTA, 2000).

Estudo com *Limoniastrum guyonianum* Durieu ex Boiss., espécie do Norte da África utilizada para tratar desintérias, demonstrou a presença de polifenóis, flavonoides e taninos condensados em suas folhas e galhos (TRABELSI et al., 2012). Mais recentemente foi isolado dessa espécie dois monômeros (*N-E*-cafeoil tiramina e *N-E*-feruloil tiramina) e um dímero inédito (limoniastramida) de amida fenólica ácida. Nesse mesmo estudo essas substâncias foram testadas *in vitro* quanto às propriedades antioxidantes, os quais apresentaram promissores resultados, com efetiva atividade antioxidante e capacidade de eliminação de radicais livres (TRABELSI et al., 2014).

Alguns autores verificaram a atividade antirradicais livres de espécies da família independente da subdivisão (ANIYA et al., 2002; NATARAJAN et al., 2006).

Estudo recente demonstra que as famílias Plumbaginaceae e Polygonaceae são grupos irmãos com filogenética próxima. O estudo do *Limonium sinense* (Girard) Kuntze mostrou que a diversidade genética dessa espécie é baixa. Esses dados são requisitos para estabelecer medidas de conservação eficientes para essa espécie (DING et al., 2012).

2.1.2 Gênero *Limonium*

O gênero *Limonium* abrange cerca de 800 espécies, das quais 166 são aceitas, sendo considerado o mais rico da família Plumbaginaceae, e estando melhor representado nas regiões mediterrâneas da Europa e Ásia, podendo também ser encontrado nas regiões litorâneas da América no norte, Sul da África e da América do Sul, além da Austrália, e tem despertado interesse pela presença de substâncias fenólicas, principalmente, taninos. Somente a espécie de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze é encontrado no Brasil (LAWRENCE, 1951; THE PLANT LIST; 2016). Em geral, as espécies de *Limonium* vivem como plantas halófitas, inclusive em regiões alpinas (CHANT, 1993). Plantas halófitas são naturalmente tolerantes ao sal e crescem em condições extremas de salinidade e, normalmente, alta temperatura, tais como dunas costeiras, restingas e estepes salinos e, são consideradas uma excelente e quase inexplorada fonte de compostos bioativos (KSOURI et al., 2010).

Murakeözy et al. (2002) verificaram e determinaram a concentração de *D*-pinitol (principal carboidrato do vegetal) em folhas e raízes de *L. gmelinii* subsp. *hungarica*, planta nativa das áreas salgadas no interior da Hungria. Além disso, foi estudada a sazonalidade dessa substância e, relacionado sua presença com a função de proteção do vegetal em estresse osmótico.

Segundo Duhazé et al. (2003), o *L. latifolium* (Sm.) Kuntze possui rotas múltiplas para a produção de β -alanina e betaína β -alanina, substâncias envolvidas na osmoproteção do vegetal. Além disso, Duhazé et al. (2002) relacionaram as vias de degradação de espermidina, substância acumulada nas raízes, com a biossíntese de β -alanina e betaína β -alanina em *L. tataricum* (L.) Mill.

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, que tiveram intoxicação hepática induzida por tetracloreto de carbono, demonstrou a redução da atividade sérica da aspartato aminotransferase e da alanina aminotransferase, característico de atividade antirradicais livres *in vivo*. Essa ação foi relacionada principalmente com a presença de ácido gálico no extrato (ANIYA et al., 2002).

Utilizando o mesmo modelo de injúria hepática, Tang et al. (2007) verificaram o efeito hepatoprotetor do extrato das raízes de *L. sinense*. Foi observado o bloqueio significativo do aumento da atividade sérica da aspartato aminotransferase e da alanina aminotransferase. Além disso, o extrato induziu a diminuição da condensação nuclear, a deposição lipídica e aumento da transcrição e tradução do canal aniônico voltagem-dependente da mitocôndria.

Extratos metanólicos produzidos com diferentes órgãos anatômicos de *L. algarvensis* Erben proveniente de Portugal foram testados em diferentes modelos *in vitro* de atividade antioxidante. As melhores atividades foram observadas para flores > raízes > pedúnculos > folhas, sendo essa atividade relacionada ao teor de polifenólicos presente. Foi relatado a presença de ácido gálico e epigallocatequina-galato (RODRIGUES et al., 2015). O decocto das flores apresentou atividade antioxidante e propriedades anti-inflamatórias similar ou maior que chá verde, que normalmente é usado sob essas alegações (RODRIGUES et al., 2016).

A análise de amostras de sementes de 17 espécies diferentes de *Limonium* (não incluindo *L. brasiliense*) constatou, pela primeira vez nessa família, a presença de fito-ecdisteroides em 7 dessas espécies [*L. bellidifolium* (Gouan) Dumort., *L. binervosum* (G.E.Sm.) C.E.Salmon, *L. gerberi* Soldano, *L. otolepis* (Schrenk) Kuntze), *L. peregrinum* (P.J.Bergius) R.A.Dyer, *L. perezii* (Stapf) F.T. Hubb. e *L. ramosissimum* (Poir.) Maire]. Além disso, o estudo demonstrou uma alta concentração dessa classe de substância nos extratos das folhas e raízes nessas espécies (WHITING et al., 1998).

Segundo Korul'kina et al. (2004a) e Zhusupova (2006), o *L. gmelinii* (Willd.) Kuntze é usado na medicina popular, na república do Cazaquistão, como adstringente, em doenças gastrointestinais e do trato respiratório superior. Essa planta medicinal possui grande potencial industrial, sendo incorporado na medicina e demonstrado ação antiexudato em estudos pré-clínicos e clínicos de fase 1 e 2, antiproliferativa, antimicrobiana e ação necrolítica no uso tópico e em mucosas.

Foram avaliados os níveis de aminoácidos e minerais presentes nas partes aéreas e raízes do *L. gmelinii* (ZHUSUPOVA, 2006). Foi verificada, significativamente, a maior concentração nas partes aéreas, o que indica seu valor biológico. Além disso, foram identificadas duas prodelfinidinas diméricas (2*R*,3*R*,4*R*-(-)-epigallocatequina-(4 β →8)-2*R*,3*R*-(-)-epigallocatequina-3-*O*-gallato e 2*R*,3*R*,4*R*-(-)-epigallocatequina-(4 β →8)-2*R*,3*R*,3,5,7,3',4',6'-hexahidroxi-flavona) do extrato hidroetanólico das raízes de *L. gmelinii* (ZHUSUPOVA; ABIL'KAEVA, 2006a), e essa espécie apresentou alto potencial antioxidante (STANKOVIC et al., 2015).

Korul'kina et al. (2004b) isolaram e identificaram, por métodos espectrométricos, substâncias biologicamente ativas das partes aéreas e raízes de *L. gmelinii* e *L. popovii* Kubank. As substâncias isoladas foram: ácido gálico, quercetina, miricetina (Figura 1A), miricetrina, epigalocatequina-3-*O*-galato, miricetina 3-*O*-β-D-(6"-galoila)-galactopiranosídeo, miricetina 3-*O*-β-D-galactopiranosídeo, miricetina 3-*O*-β-D-glucopiranosídeo, miricetina 3-*O*-β-D-(6"-galoila)-glucopiranosídeo, 3,5,7,3',4',6'-hexahidroxiflavona, miricetina 3-*O*-α-L-(2'-galoila)-arabinopiranosídeo, sendo as duas últimas inéditas na literatura. Também foram isolados de *L. gmelinii*, os flavan-3-óis, galocatequina e epigalocatequina (ZHUSUPOVA; ABIL'KAEVA, 2006b). Anteriormente, já haviam sido isolados derivados glicosilados de miricetina do *L. sinuatum* (L.) Mill. (ROSS, 1984).

Foi estudada a composição de ácidos graxos presentes nas raízes e partes aéreas de diferentes espécies de *Limonium* da região do Cazaquistão (*L. gmelinii*, *L. otolepis*, *L. popovii*, *L. myrianthum* (Schrenk ex Fisch. & C.A. Mey.) Kuntze, *L. leptophyllum* Kuntze, *L. suffruticosum* Kuntze). Verificou-se que a composição qualitativa de ácidos graxos saturados e insaturados foi a mesma, porém, houve diferenças quantitativas entre as espécies. Além disso, verificou-se a maior concentração nas folhas em relação às flores e que a concentração de ácido graxo insaturado foi de duas a quatro vezes maior que de saturado nas partes aéreas (ZHUSUPOVA et al., 2006a; ZHUSUPOVA et al., 2006b). O comportamento vegetativo pela variação da salinidade também foi estudado em *L. linifolium* (L.f.) Kuntze, uma espécie endêmica da África do Sul (TABOT; ADAMS, 2014).

A *L. bicolor* (Bunge) Kuntze, planta originária da China, é utilizada popularmente como enriquecedor do sangue e homeostático, na cura de desordens menstruais e no tratamento de carcinomas uterinos. Foram isoladas e identificadas três substâncias flavônicas do extrato das partes aéreas (ZHANG; ZOU, 2004). Recentemente, alguns estudos sobre o controle do processo de secreção glandular salina a fim de definir a tolerabilidade dessa espécie à meios salinos vem sendo desenvolvidos (DENG et al., 2015; FENG et al., 2015), assim como a influência da salinidade sobre a germinação de sementes de *L. tabernense* Erben oriunda na Espanha (FERNÁNDEZ et al., 2016).

Foram identificados cinco flavonoides derivados da miricetina nas folhas e raízes de *L. meyeri* (Boiss.) Kuntze, planta popularmente usada na Ásia (MOVSUMOV; GARAEV, 2005), e em *L. aureum* (L.) Hill, também da Ásia, foram encontrados 14 flavonoides, entre eles, miricetina e seus derivados, quercetina e seus derivados, homoeriodictiol, naringenina, eriodictiol (Figura 1B) e canferol (YE; HUANG, 2006). Em *L. caspium* (Willd.) P. Fourn. também foram identificados 9 derivados da miricetina, assim como floridzina e tiramina, sendo que algumas dessas substâncias apresentaram excelente atividade antifúngica, antimalária e antileishmaniose (GADETSKAYA et al., 2015).

Estudos com o extrato etanólico do *L. sinense*, planta chinesa, demonstraram que o extrato é efetivo contra o vírus da Herpes Simplex tipo 1. Pelo fracionamento bioquímico isolou-se a

samarangenina B (Figura 1C), que pelos ensaios mostrou ser um agente antiviral contra a replicação do vírus e, aparentemente, sem citotoxicidade *in vitro* (KUO et al., 2002; LIN et al., 2000). Recentemente, polissacarídeos isolados das raízes de *L. sinense* demonstraram atividade antitumoral e imunomoduladora em tumor de camundongos transplantados, além da identificação de um polissacarídeo relacionado a esta atividade (TANG et al., 2012; TANG et al., 2014). Em um estudo *in vitro* envolvendo tanto extrato etanólico das partes subterrâneas dessa espécie, como a substância isolada ácido gálico, foi observado que ambos apresentaram potente atividade em suprimir a infecção dos hepatócitos pelo vírus da hepatite C, bloqueando a entrada do vírus na célula (HSU et al., 2015).

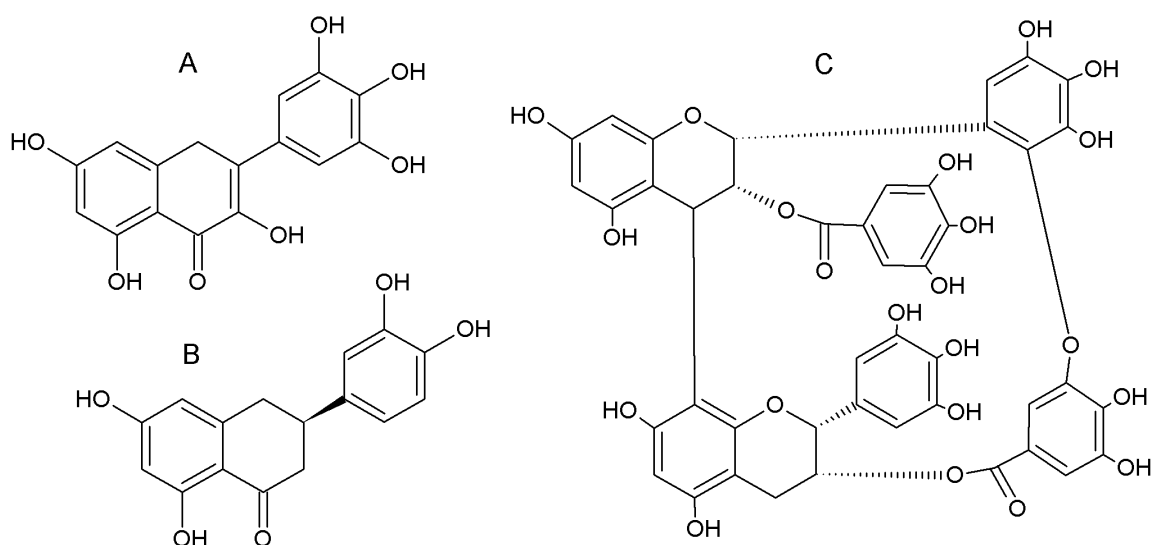


Figura 1: Estruturas químicas de miricetina (A), eriodictiol (B) e samarangenina B (C) identificadas em espécies do gênero *Limonium*.

A pesquisa de compostos com atividade antioxidante em *L. aureum* foi realizada utilizando-se um método otimizado, *on line*-CLAE 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*-glucosídeo, miricetina, eridictiol e homoeridictiol (GENG et al., 2015).

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), apresentando melhor resultado com o extrato etanólico contra vírus HSV-1 o qual exibiu potente ação inibitória. Esses extratos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD), demonstrando a presença de flavonoides e saponinas como a classe de produtos naturais majoritários (MEDINI et al., 2014a). Esses extratos também foram testados para a atividade antioxidante pelo método de capacidade de absorvância do radical oxigênio (método ORAC), atividade de eliminação do ânion superóxido e atividade em células. A avaliação da atividade anti-inflamatória ocorreu por

quantificação do óxido nítrico. 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. A análise por CLAE demonstrou a presença majoritária de miricetina, ácido *trans* 3-hidroxicinâmico e isoramnetina (MEDINI et al., 2015).

A atividade antioxidante de 10 extratos de brotos de *L. delicatulum* (Girard) Kuntze em diferentes estágios fisiológicos (5 extratos obtidos a partir do estágio de floração e 5 extratos a partir do estágio vegetativo) foi avaliada frente ao radical DPPH. Os extratos mais polares, acetona, metanol e etanol, do estágio de floração, apresentaram maior eficiência como antioxidante quando comparados aos extratos aquosos e hexânicos. Estes extratos também apresentaram melhor atividade antimicrobiana contra 7 patógenos humanos Gram-positivos e Gram-negativos. Foram identificados por CLAE compostos fenólicos nesses extratos, sendo os principais o ácido *p*-cumárico e ácido clorogênico os quais foram associados ao melhor desempenho desses extratos (MEDINI et al., 2014b).

Esse gênero parece ser importante em estudos ecológicos, tal como a avaliação populacional de *L. girardianum* (Guss.) Kuntze, espécie endêmica do Mediterrâneo (litoral da França e Espanha) em locais com perturbações causadas pelo homem, especialmente, expansão industrial (BAUMBERGER et al., 2012). Outro ponto interessante é a utilização de plantas halofíticas (com potencial acúmulo e secreção de sais), como o *L. gmelinii*, serem usadas na reciclagem de cloreto de sódio em resíduos humanos em sistemas de suporte biorregenerativos (BALNOKIN et al., 2010; TIKHOMIROVA et al., 2011).

2.1.3 *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze

Inicialmente, designado como *Statice brasiliense* Boiss. (DE CANDOLLE, 1848), foi apresentada, por Kuntze (1891) pelo nome botânico *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Figura 2) e apresenta outros seis sinônimas (THE PLANT LIST, 2016). É conhecida, popularmente, como baicuru e guaicuru. É uma erva perene, distribuída pela Argentina, Uruguai e sul do Brasil – Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul – preferencialmente em terrenos baixo e sujeitos à maré (solo salino) (MOURA, 1984; MURRAY et al., 2004), podendo ser encontrado até o Rio de Janeiro (FLORA DO BRASIL, 2016). Engler (1964) classificou *L. brasiliense* como uma espécie pertencente à família Plumbaginaceae e a subfamília Staticeae.



Figura 2: *L. brasiliense*, partes aéreas e rizomas. Foto: Andressa Blainski. Amostras secas de *L. brasiliense*: Rizoma longo e calibroso (seta) (A) com ramos laterais mais delgados e envoltos pelas bases peciolares avermelhadas (setas) (B); detalhes da periderme (C) e dos tecidos internos (D) (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2015a).

As características morfo-anatômicas do rizoma de baicuru foram relatadas somente na primeira edição da Farmacopeia Brasileira (SILVA, 1926). 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, 1984). Recentemente, Antonelli-Ushirobira et al. (2015a) determinaram ser rizomas e não raízes a parte da planta utilizada pela população como medicinal, pela presença de entrenós nas brotações laterais nos tecidos jovens, presença de periderme multiestratificada, raios parenquimáticos, presença de aerênquima, feixes vasculares dispostos radialmente e grupos de escleroides dispersos pelo córtex e medula.

Estudo prévio descreveu a presença de aminas, fenóis e traços de leucoantocianinas e compostos cianogênicos nas partes aéreas de *L. brasiliense* (MEDINA et al., 1977). Taninos, leucoantocianinas, ácido hidroxicinâmico e ácido elágico foram detectados nas partes subterrâneas (RAGONESE; MILANO, 1984). Cardoso (1990) verificou a presença de ácido gálico, epicatequina e taninos condensados por técnica de cromatografia em camada delgada. A interferência de fatores tecnológicos na produção de extratos (diferente teor alcoólico, tempo de maceração, granulometria da droga, método de extração) foi avaliada sobre a quantidade de ácido gálico extraído. O conteúdo de polifenóis totais (PT) do extrato acetona:água (7:3, v/v) dos rizomas de *L. brasiliense* foi determinado por método espectrofotométrico de ultravioleta e visível (UV-VIS). O método desenvolvido e validado determinou 23,5% de PT no extrato, expressos em pirogalol (BLAINSKI et al., 2013).

Foram verificadas atividades biológicas do extrato etanólico dos rizomas, como anti-inflamatória e antagonista de bradicinina e ocitocina em associação com paracetamol. Estudo clínico dessa associação foi realizado com 36 mulheres com sintomas relacionados à desordens menstruais, tais como dismenorreia, leucoreia e amenorreia. O resultado foi avaliado como excelente em 83,33%, bom em 13,88% e regular em 2,77% das mulheres. O período de tratamento variou de 11 a 50 dias (JANHS; CRESCENTE, 1976). Rosito-Filho (1975) verificou a sensibilidade que algumas cepas de *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* entre outras ao extrato hidroetanólico de baicuru. Além disso, verificou a presença de taninos hidrolisáveis, condensados, ácido 4-metóxi-gálico, β -sitosterol e saponinas triterpênicas. Faral-Tello et al. (2012) demonstraram interessante atividade antiviral de extrato etanólico (70%) de *L. brasiliense* frente ao vírus herpes simples tipo I (HSV-1), o qual inibiu a replicação *in vitro*, com IC₅₀ de 185 μ g/mL.

Foi determinada a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico dos rizomas de baicuru pela inibição do edema da pata do rato, induzido por carragenina, pela administração intraperitoneal na dose de 250 mg/kg, sendo os taninos os principais responsáveis por essa atividade. A ação antibacteriana foi relatada, sendo o ácido gálico responsável pelo efeito. O extrato apresentou sinais expressivos de toxicidade, pelo teste de toxicidade excessiva, na administração intravenosa (veia caudal), somente na dose de 2,0 g/kg e nenhuma letalidade até a dose de 1,5 g/kg. Além do ácido gálico, foram isolados ácido elágico, β -sitosterol, benzoato de benzila, sacarose, miricetina, uma flavona, uma isoflavona, uma flavonona, uma cumarina e três saponinas triterpênicas (MOURA, 1984).

A avaliação da toxicidade aguda deste extrato em camundongos machos e fêmeas Swiss foi determinada pela DL₅₀ de 4,8 g/kg. A avaliação da toxicidade crônica mostrou que o extrato bruto, mesmo em doses acima da considerada terapêutica, mantém-se seguro ao uso. A avaliação da mutagenicidade, pelo teste do micronúcleo, demonstrou potencial mutagênico em doses acima de 2,0 g/kg. A avaliação da atividade hormonal em ratas Wistar imaturas mostrou um efeito do tipo antiestrogênico em doses elevadas (400, 800 e 1200 mg/kg) pela análise citológica da secreção vaginal, com prolongamento do ciclo estral com predomínio da fase diestro (período progesterônico) das ratas; e, pela avaliação histológica, com presença de estruturas morfológicas característicos do período progesterônico. Estudo com as doses de 12,5, 25, 50, 100 ou 200 mg/kg mostraram o retardo na idade de abertura do canal vaginal e, a avaliação do aumento do peso relativo do útero, e dosagens de progesterona e estrogênio. A análise histológica dos órgãos útero, ovários e vagina, os resultados indicam uma tendência da ação da progesterona nas doses de 25, 50 ou 100 mg/kg (ANTONELLI-USHIROBIRA, 2015; ANTONELLI-USHIROBIRA et al, 2015b; BLAINSKI, 2010).

Rodriguez et al. (2011) testaram *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, sendo que

o composto isolado apresentou o melhor resultado do que o extrato. Murray et al. (2004) avaliaram a atividade antioxidante, pela determinação do IC_{50} através da habilidade de quelar radicais livres usando o método de DPPH. Foi avaliado o extrato metanólico dos rizomas de *L. brasiliense*. Foi isolado miricetina-3-*O*- α -raminopiranosídeo como componente mais ativo ($IC_{50} = 40,0 \mu M$), o extrato metanólico rico com esta substância apresentou IC_{50} de $20,7 \mu M$. Também foram verificadas a presença de ácido gálico, epigalocatequina, galocatequina e epigalocatequina-3-*O*-galato.

No estudo bibliográfico e etnobotânico realizado por Fenner et al. (2006), *L. brasiliense* foi uma das espécies citadas pela população e usada no tratamento de úlceras e leucorreias, estando seu uso relacionado a uma potencial atividade antifúngica. Moura (1984) relata a comercialização de produtos industriais à base de baicuru pelos Laboratórios Regius (Elixir de Baicuru), Cageri (Tintura de Baicuru e Elixir de Agoniada e Baicuru), Flora da Índia (Elixir de Agoniada e Baicuru) e Klein (Tintura de Baicuru), além da comercialização em outros países da América do Sul.

Os medicamentos relatados na base de dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estão todos com o registro vencido. Os medicamentos são Elixir de Baicuru, Elixir de Caju e Chapéu de Couro (Laboratório Regius), Elixir de Caroba Composto (Laboratório Kley Hertz) e Agoniada Composto (Laboratório Cibecol) e o vencimento do registro foi em agosto/2003, setembro/2004, maio/2006 e dezembro/2005, respectivamente (ANVISA, 2012).

Os aspectos reprodutivos e caracterização ambiental de populações de *L. brasiliense* foi inicialmente avaliados no litoral de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Verificaram-se que diferenças ambientais entre os anos de 2005 e 2006 influenciaram os aspectos reprodutivos (infloração e infrutescência) de espécie nessas regiões (FIOR et al., 2007).

Nota-se que *L. brasiliense* não tem importância apenas medicinal como também ornamental na região sul do Brasil. Estudo avaliou que a reprodução assexuada (por mudas do rizoma) foi indiferente ao substrato utilizado (marisma, areia ou comercial), mas houve maior produção de folhas em mudas provenientes do rizoma apical, porção mais jovem do rizoma (LOPES et al., 2003).

2.2 ASPECTOS QUÍMICOS

2.2.1 Substâncias Fenólicas

As substâncias fenólicas abrangem uma ampla variedade de substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes em comum. As substâncias fenólicas tendem a ser hidrossolúveis, pois ocorrem mais frequentemente combinadas com açúcares como glicosídeos (HARBORNE, 1998).

As substâncias fenólicas contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitas delas importantes economicamente pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. Têm-se relatado atividade antioxidante, sugerindo que doenças causadas pelas oxidações reativas em sistemas biológicos poderiam ser retardadas pela ingestão de substâncias

fenólicas (CARVALHO et al., 2007). Pulido et al. (2000) afirmaram que o grau de hidroxilação e extensão de conjugação parecem ser os critérios que regem o poder redutor dos polifenóis da dieta.

O processo clássico para detectar fenóis simples utiliza solução aquosa ou alcoólica de cloreto férrico a 1%, obtendo-se assim colorações verde, púrpura, azul ou preta (HARBORNE, 1998). Além disso, os fenólicos são todos aromáticos, sendo assim, todos mostram uma intensa absorção na região do UV (CARVALHO et al., 2007; HARBORNE, 1998). Métodos espectrofotométricos são, dessa forma, especialmente importantes para as análises de identificação e quantificação de fenóis (HARBORNE, 1998).

Substâncias polifenólicas possuem estrutura química ideal para a atividade de sequestro de radicais livres, e têm mostrado serem antioxidantes mais eficientes *in vitro* do que a vitamina C e a vitamina E, quando comparados em concentrações molares (RICE-EVANS et al., 1997). Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que quando presente em baixas concentrações, comparadas com aquelas do substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação do substrato (ANTOLOVICH et al., 2002).

Suresh e Asha (2008) reportaram o efeito preventivo do extrato etanólico de *Phyllanthus rheedii* Wight. em danos hepáticos induzidos por *D*-galactosamina em ratos Wistar. Essa planta medicinal é popularmente utilizada para doenças hepáticas e, no presente trabalho, sua ação foi relacionada ao potencial antioxidante e a presença majoritária de compostos fenólicos como taninos e flavonoides.

Zamblé et al. (2008) avaliaram as propriedades antioxidantes das raízes de *Caesalpinia benthamiana* (Baill.) Herend. & Zarucchi, planta popularmente usada como estimulante sexual, e concluiu haver atividade contra as espécies de oxigênio reativo em sistema celular pela presença de ácido gálico, resveratrol e taninos. Como a atividade antioxidante está amplamente envolvida na prevenção de doenças cardiovasculares, foi associada esta ação ao efeito vasodilatador, também avaliado neste trabalho, e constatando o potencial medicinal dessa droga.

Mulheres em idade fértil frequentemente recorrem ao uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças ginecológicas crônicas, tais como infertilidade, dismenorreia, menopausa e tensão pré-menstrual. A atividade antioxidante é um dos mecanismos envolvidos na efetividade dessas drogas (DENNEHY, 2006).

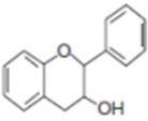
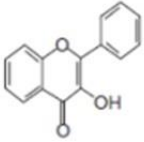
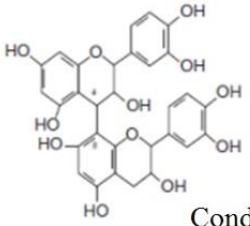
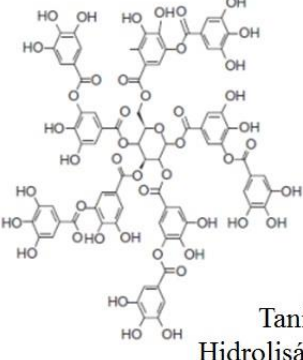
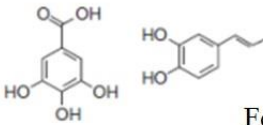
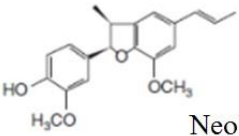
A ação antimicrobiana de substâncias fenólicas já é bem conhecida (Quadro 1) e as pesquisas vêm revelando espectro de ação cada vez mais amplo, como a ação antifúngica por proantocianidinas poliméricas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville contra *Candida albicans* (ISHIDA et al., 2006; LUIZ et al., 2015) e *Cryptococcus neoformans* (ISHIDA et al., 2009), contra Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae* por extrato aquoso de *Quercus* sp. associado ao alto teor de polifenóis (SÁNCHEZ-BURGOS et al., 2013), assim como por extrato de *Pelargonium sidoides* DC., que também foi efetivo contra *Proteus mirabilis* e *S. aureus* multi-resistentes (KOLODZIEJ et al., 2003) e

nanopartículas de catequinas do chá verde contra *Streptococcus mutans* (GOPAL, et al., 2016). O mecanismo de ação de polifenóis para a inibição do crescimento bacteriano é diverso e, em parte, relacionado ao seu potencial antioxidante: pode desestabilizar a membrana citoplásmica, aumentar a permeabilidade da membrana celular, inibir enzimas extracelulares, agir sobre o metabolismo celular e sobre a deprivação de substratos essenciais, tais como micronutrientes minerais (DAGLIA, 2012).

Vários flavonoides de *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. foram capazes de diminuir os valores de MIC para oxacilina contra MRSA (HATANO et al., 2000). Da mesma forma, teasinensin A, produto da degradação de epigallocatequina-galato, melhorou a ação da oxacilina em MRSA (HATANO et al., 2003; HATANO et al., 2008), assim como procianidinas B2 e B3 de *Ziziphus jujuba* Mill. e *Zanthoxylum piperitum* Benn. (HATANO et al., 2005). Além disso, estudo testou 32 compostos fenólicos de *G. uralensis* contra enterococos resistentes a vancomicina (VRE) e verificou a suscetibilidade à dois flavonoides (5,7-di-*O*-metilluteona e dimetilglicerol), assim como à ácidos fenólicos de 3-*arilcumarinas* (EERDUNBAYAER et al., 2014).

No âmbito da farmacocinética, pesquisas já vêm sendo realizadas com polifenóis, como flavonoides e taninos, principalmente na forma glicosilada, a fim de avaliar o metabolismo e biodisponibilidade *in vitro* e *in vivo*. Porém, deve-se considerar que o preparo das amostras biológicas (plasma, fluido biliar, urina ou tecidos) é bastante delicado, pois envolve matrizes de alta complexidade e analitos em baixas concentrações (CROZIER et al., 2010; PRASAIN et al., 2004).

Krook e Hagerman (2012) submeteram dois polifenóis comuns (epigallocatequina-*O*-galato – EGCg – e 1,2,3,4,6-penta-*O*-galoil- β -D-glucopiranosídeo –PGG) a um modelo de sistema digestivo *in vitro* sob baixa tensão de O₂ e, verificaram que ambas substâncias são estáveis em pH 5-6 e degradam em pH 7 e na presença de componentes alimentares e, somente PGG foi estável na presença de enzimas gastrointestinais.

 <p>Flavan-3-ol</p>	<p>Antibacteriano</p> <p><i>V. cholerae</i> – <i>S. mutans</i> – <i>C. jejuni</i> <i>C. perfringens</i> – <i>E. coli</i> – <i>B. cereus</i> <i>H. pylori</i> – <i>S. aureus</i> – <i>L. acidophilus</i> <i>A. naeslundii</i> – <i>P. oralis</i> – <i>P. gingivalis</i> <i>P. melaninogenica</i> – <i>F. nucleatum</i> <i>C. pneumonia</i></p>
 <p>Flavonol</p>	<p>Antiviral</p> <p>Adenovirus – Enterovirus - Influenza</p> <p>Antifúngico</p> <p><i>Candida albicans</i> <i>Microsporium gyseum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>Trichophyton rubrum</i></p>
 <p>Taninos Condensados</p>	<p>Antibacteriano</p> <p><i>S. mutans</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i></p> <p>Antiviral</p> <p>Virus da Influenza A</p>
 <p>Taninos Hidrolisáveis</p>	<p>Antibacteriano</p> <p>Diferentes cepas de: <i>Salmonella</i> <i>Staphylococcus</i> – <i>Helicobacter</i> <i>E. coli</i> – <i>Bacillus</i> – <i>Clostridium</i> <i>Campylobacter</i> - <i>Listeria</i></p> <p>Antiviral</p> <p>Virus Epstein-Barr Virus da Herpes HSV-1 e HSV-2</p> <p>Antifúngico</p> <p><i>Candida parapsilosis</i></p>
 <p>Ácidos Fenólicos</p>	<p>Antibacteriano</p> <p><i>S. aureus</i> – <i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> – <i>P. aeruginosa</i></p>
 <p>Neolignanas</p>	<p>Antibacteriano</p> <p>Diferentes cepas de: <i>Mycobacterium tuberculosis</i></p>

Quadro 1: Estrutura química de classes de polifenóis e microrganismos sensíveis a estes (DAGLIA, 2012).

Monômeros de flavan-3-ol de chá verde e seus metabólicos metilados, sulfatados e glucuronidado foram analisados em amostras de plasma de voluntários saudáveis. De modo similar, cinco diferentes metabólitos de quercetina-4'-O-glucosídeo e quercetina-3,4'-O-diglucosídeo presentes na cebola, foram dosados em plasma (assim como a quercetina na forma aglicona) e urina humanos, da mesma forma, os metabólitos da quercetina-3-O-rutinosídeo de suco de tomate e metabólitos de

flavononas de suco de laranja em plasma. Antocianidinas presentes em produtos vegetais, tais como morangos e mirtilos, foram detectadas em plasma, e verificou-se o acúmulo dessas substâncias em tecidos hepáticos, renal e pulmonar (CROZIER et al., 2010; HOLLMAN et al., 1996). Dímeros de procianidinas B1 e B2 do extrato de semente de uva foram detectados em plasma humano e diferentes metabólitos de elagitaninos da romã foram detectados plasma de voluntários sadios (CROZIER et al., 2010).

Testes em ratos mostram a presença no plasma de luteolina, canferol, apigenina, quercetol e isoramnetina de *Verbena officinalis* L. (DUAN et al., 2011); luteolina e apigenina de *Chrysanthemum morifolium* Ramat., assim como dois metabólitos derivados da luteolina (CHEN et al., 2012); vitexina-4"-O-glucoside e vitexina-2"-O-ramnosideo de *Crataegus* sp (MA et al., 2007), assim como em tecidos (coração, fígado, baço, pulmão, rins e cérebro), bile, urina e fezes e, verificou-se que há um alto acúmulo dessas substâncias no fígado e rins (MA et al., 2010); flavonoides de *Scutellaria barbata* D.Don (escutelarina, naringenina, apigenina, luteolina e wogonina) (SHI et al.; 2011); ácidos fenólicos de *Salvia miltiorrhiza* Bunge (ZHANG et al., 2011) e, marcadores (quercetina, canferol, isoramnetina) do *Ginko biloba* L. têm aumento da biodisponibilidade pela complexação do extrato com fosfolipídio (CHEN et al., 2010).

2.2.2 Taninos

A palavra tanino foi usada pela primeira vez por Seguin, em 1796, para definir o princípio adstringente da casca de carvalho que possui a propriedade de transformar a pele dos animais em couro (COSTA, 2002).

Taninos constituem um grupo de produtos naturais de grande diversidade estrutural e larga distribuição filogenética (HASLAM et al., 1975), sendo que sua ocorrência nas angiospermas é particularmente associada aos tecidos lenhosos (HARBORNE, 1998).

Industrialmente, os taninos são substâncias que, devido à habilidade de se complexarem com proteínas, são capazes de transformar peles de animais em couro. Nas plantas, devido ao seu sabor adstringente, uma das maiores funções dos taninos é a de ser uma barreira para herbívoros e insetos (HARBORNE, 1998).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas enfermidades, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, problemas estomacais, problemas renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996).

Testes *in vitro* realizados com extratos ricos em taninos ou com taninos puros têm identificado diversas atividades biológicas dessa classe de substâncias. Dentre essas atividades podem-se citar: ação bactericida, fungicida (SCALBERT, 1991; SANCHES et al., 2005), antiviral (OKUDA et al., 1993; FELIPE et al., 2006), moluscicida (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985), inibição de enzimas

como glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (HATTORI et al., 1990; OOSHIMA et al., 1993), ação antitumoral (OKUDA et al., 1989), atividade de inibição de *Herpetomonas samuelpeessoai* (HOLETZ et al., 2005), atividade cicatrizante (LOPES et al., 2005), atividade de inibição de *Candida albicans* (ISHIDA et al., 2006) e antinociceptivo (MELO et al., 2007), gastroprotetivo e antitopoisomerase (SÁNCHEZ-BURGOS et al., 2013). Os taninos podem atuar também como captadores de radicais, interceptando o oxigênio ativo formando radicais estáveis (SANTOS; MELLO, 2007).

Tradicionalmente os taninos são classificados segundo sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados ou proantocianidinas. Os taninos hidrolisáveis (Figura 3) são caracterizados por um poliol central cujas funções hidroxilas são esterificadas com ácido gálico e podem estar presentes na forma de monômeros, dímeros, trímeros e tetrâmeros. Os taninos condensados (Figura 4) são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol (SANTOS; MELLO, 2007).

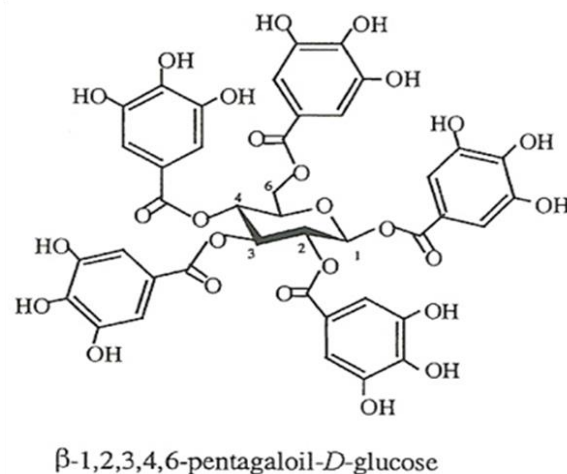


Figura 3: Exemplo de tanino hidrolisável (SANTOS; MELLO, 2007).

Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos são devidas, pelo menos em parte, a três características gerais que são comuns em maior ou menor grau aos dois tipos de taninos, condensados e hidrolisáveis. Tais características são: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de se complexar com macromoléculas como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996).

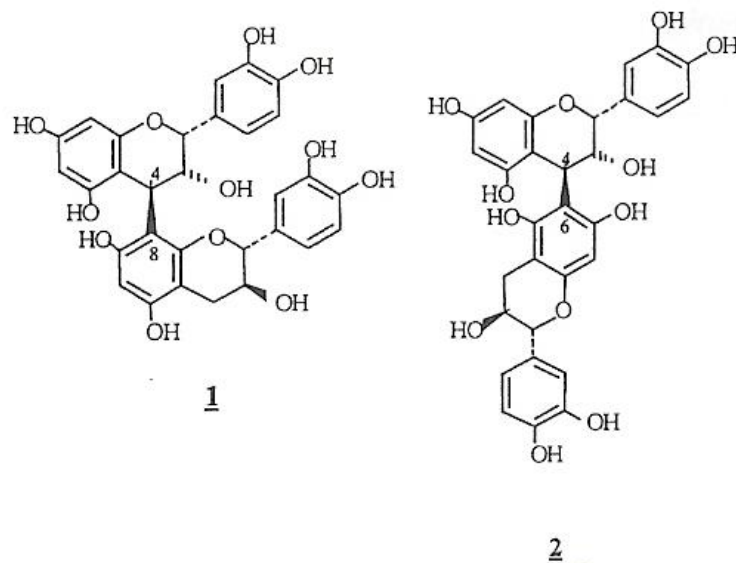


Figura 4: Exemplos de taninos condensados (1: epicatequina-(4 β →8)-catequina; 2: epicatequina-(4 β →6)-catequina) (SANTOS; MELLO, 2007).

A variabilidade estrutural de taninos hidrolisáveis é devido ao acoplamento oxidativo de unidades vizinhas de ácido gálico ou pela oxidação dos anéis aromáticos. Estas reações podem levar a formação de taninos hidrolisáveis de alta complexidade que são dificilmente detectados em técnicas colorimétricas, uma vez que estas detectam somente produtos mais simples, como o galol ou o hexahidroxidifenol (MUELLER-HARVEY, 2001).

Os taninos condensados são polímeros de unidades flavanol, que estão unidas por acoplamento oxidativo. Os taninos condensados podem ser solúveis ou insolúveis (alto peso molecular ou cadeia linear) (SCHOFIELD et al., 2001).

Para o processo de extração de taninos recomenda-se, devido a foto- e termo-sensibilidade dessas substâncias, a utilização da planta fresca ou, numa segunda opção, a droga vegetal liofilizada. Entretanto, estas condições podem ser inviáveis, assim, se utiliza, frequentemente, o material seco a baixa temperatura (<40 °C) em estufa de ar circulante. Os taninos apresentam diferentes solubilidades e, por tanto, permite a extração com diferentes solventes. Em geral, prefere-se usar a mistura água-acetona por ser menos suscetível a reagir com os taninos hidrolisáveis (MUELLER-HARVEY, 2001; SCHOFIELD et al., 2001).

Várias técnicas são empregadas para a análise de taninos. Embora as técnicas colorimétricas sejam amplamente usadas, elas, muitas vezes, não representam um dado quantitativo exato, pois muitos compostos fenólicos possuem a propriedade de alterar diferentemente a cor por unidade de massa. Dessa forma, a utilização de um padrão externo implica na obtenção de um dado semi-quantitativo voltado, principalmente, para o propósito comparativo. Para determinação colorimétrica de fenólicos totais, destaca-se a reação com Folin-Ciocalteu. Como alternativa aos métodos colorimétricos, métodos gravimétricos já foram propostos, entretanto, estes são muito menos sensíveis

e pouco robustos. Dentre os métodos gravimétricos, o ensaio com azul de prússia é, provavelmente, o mais conhecido deles (MUELLER-HARVEY, 2001; SCHOFIELD et al., 2001).

Reações colorimétricas específicas para taninos hidrolisáveis já foram propostas, destacam-se os ensaios com reagente KIO_3 fornecendo coloração rosa, reagente de Rhodanine para cor púrpura e, reagente $NaNO_2$ para cor vermelho. Entretanto, estas reações apresentam algumas desvantagens, como a especificidade para alguns grupos de taninos hidrolisáveis e/ou a inviabilidade da execução da técnica numa rotina laboratorial (MUELLER-HARVEY, 2001). Para taninos condensados, destacam-se as análises colorimétricas com butanol-HCl e vanilina produzindo antocianidinas vermelhas. Além disso, para taninos insolúveis, usa-se técnica de ressonância nuclear magnética de carbono 13 (RMN- ^{13}C). Ensaio enzimáticos e por precipitação de proteínas são possíveis para análise de taninos. Estes ensaios têm como principal vantagem refletir o modo biológico de ação. Entretanto, depende de muitas variáveis, principalmente a escolha da enzima ou proteína adequadas (SCHOFIELD et al., 2001).

Para a triagem de amostras vegetais, técnica como cromatografia em camada delgada (CCD), considerada simples e acessível, são fundamentais na pesquisa e controle de qualidade de taninos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também é utilizada para a separação de taninos hidrolisáveis e condensados e, é possível tanto o uso de colunas de fases normais como reversas. Técnicas mais modernas são usadas para determinar a identidade estrutural dos taninos. Destacam-se a RMN e a espectrometria de massas, sendo a espectrometria de massas por tempo-de-vôo com dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS) a mais apropriada devido ao alto peso molecular das substâncias (MUELLER-HARVEY, 2001; SCHOFIELD et al., 2001).

Os ensaios biológicos, bioquímicos e químicos devem ser abordados em conjunto quando se considera o estudo de taninos. Somente quando se conhece o composto ativo e suas propriedades é que torna possível a escolha de uma técnica analítica particular e exata (MUELLER-HARVEY, 2001).

Encontram-se vários estudos sobre taninos em diferentes áreas. Na determinação de método de avaliação quantitativa de taninos (HAGERMAN; BUTLER, 1978; HAGERMAN; BUTLER, 1980a; PRICE et al., 1980; WILSON; HAGERMAN, 1990; HARTZFELD et al., 2002; CHEN; HAGERMAN, 2004a; CLOSE et al., 2005), purificação de taninos isolados por métodos de precipitação com proteínas (HAGERMAN; BUTLER, 1980b), estudo da forma de interação com proteínas (JUNTHEIKKI et al., 1996; CHEN; HAGERMAN, 2004b; HOFMANN et al., 2006), atividade antioxidante (HAGERMAN et al., 1998; BARBEHENN et al., 2006), estabelecimento dos marcadores biológicos para o *stress* oxidativo (ALESSIO et al., 2000; ALESSIO et al., 2002; ALESSIO et al., 2005; PETERS et al., 2006), relação do complexo tanino-proteína e atividade antioxidante (RIEDL; HAGERMAN, 2001; HAGERMAN et al., 2003), interferência dos taninos na absorção intestinal e no balanço da dieta alimentar (SEIBELS et al., 2003; SKOPEC et al., 2004; CAI

et al., 2006) e, por fim, avaliação da ação de diferentes taninos em cultura de células a fim de elucidar seu mecanismo bioativo (WISMAN et al., 2008).

Os radicais livres estão envolvidos no mecanismo de várias patologias, entre elas o envelhecimento cutâneo (HIRATA et al., 2004), problemas cardiovasculares (BAGCHI et al., 2003), agregação plaquetária (FREEDMAN et al., 2001), câncer (LOGT et al., 2005; HERVOUERT et al., 2007); glaucoma (IZZOTTI et al., 2006; SZAFLIK et al., 2010). De Bruyne et al. (1999) em sua revisão sobre taninos reportaram a importante propriedade antioxidante de taninos condensados, frente ao DPPH, superóxido ânion e o radical hidroxila.

Os taninos demonstram ser potentes antioxidantes. Moreira et al. (2002) demonstraram a atividade antioxidante *in vitro* das frações isoladas de *Pseudopiptadenia contorta* Rauschert, sendo que as substâncias isoladas ácido gálico, epicatequina e os galatos de catequina apresentaram resultados bastante significativos. O efeito antioxidante das proantocianidinas presentes no extrato de cacau (*Theobroma cacao* L.) foi avaliado por Osakabe et al. (2000) e Hatano et al. (2002), frente à peroxidação lipídica, obtendo-se resultados positivos. O mesmo foi proposto por Negro et al. (2003) em seu trabalho com proantocianidinas isoladas do vinho. Masaki et al. (1994) reportaram uma potente atividade de hamamelitaninos, e ácido gálico frente a ensaios químicos e biológicos para a determinação da atividade antioxidante. A avaliação de epicatequina, administrada oralmente em ratos, mostrou que a mesma possui capacidade em promover um aumento das defesas antioxidantes no plasma dos animais tratados, quando comparados ao controle. Estudo verificou que o epigallocatequina-3-*O*-galato, principal catequina do chá-verde, inibe a produção de proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) mediada por TNF- α . Esta proteína é a principal responsável por doenças cardiovasculares inflamatórias (AHN et al., 2008).

Gu et al. (2008) extraiu taninos de alto peso molecular e de baixo peso molecular em diferentes frações do *Diospyros kaki* L.f. As análises de LC-MS demonstraram que o ácido gálico foi o principal componente da fração de baixo peso molecular e, na de alto peso, foi determinado o intervalo de $1,16 \times 10^4$ a $1,54 \times 10^4$ Da. A fração de alto peso molecular apresentou atividade antioxidante fortemente maior que a fração de baixo peso em todos os testes realizados (atividade de quelação pelo sistema de oxidação 2-deoxirribose e sistema ácido salicílico, atividade de quelação do ânion superóxido e atividade de inibição da peroxidação lipídica). Essa fração testada *in vivo* e *ex vivo* confirmou a prevenção da inibição da atividade plasmática da glutatona peroxidase e superóxido dismutase hepática em indução por bromobenzeno (TIAN et al., 2012).

Heim et al. (2002) propôs que, embora a capacidade antioxidante seja primariamente atribuída à alta reatividade das hidroxilas, o arranjo espacial desse substituintes são determinantes para o potencial da atividade antioxidante. Grupos *O*-metilados pode diminuir o potencial antioxidante devido ao impedimento estérico ou pela hidrofobicidade e planaridade molecular. Com relação ao grau de polimerização, devido a complexidade estrutural e a diversidade dos taninos, a relação estrutura-

atividade é menos conhecida. De forma geral, sabe-se que dímeros e trímeros de procianidinas são mais ativos que flavonoides monomérica.

2.2.3 Flavonoides

Os flavonoides constituem uma importante classe de polifenóis, sendo um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural e é amplamente distribuído no reino vegetal. São conhecidos mais de 4200 flavonoides, sendo que o número de novas estruturas identificadas particularmente dobrou nos últimos 20 anos. São divididas em mais de 10 classes, podendo citar flavonóis, flavonas, flavanonas, antocianidinas, chalconas, flavanóis, isoflavonas e outros (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Do ponto de vista estrutural, flavonoides são sintetizados a partir dos fenilpropanoides e, a grande maioria dos compostos dessa classe apresenta 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental (Figura 5) (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

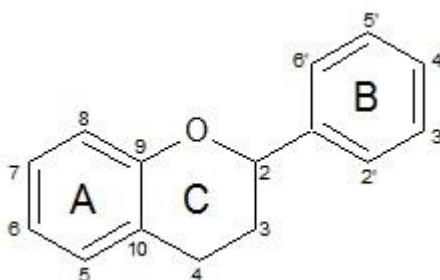


Figura 5: Núcleo fundamental dos flavonoides e sua numeração (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007 - mod.).

Os flavonoides podem se ligar a açúcares formando compostos *O*-heterosídicos ou *C*-heterosídico. Geralmente, este último pode ser formado por uma ligação açúcar-genina nos carbonos 6 e/ou 8 do Anel A. A principal característica é a resistência à hidrólise ácida nos compostos *C*-heterosídico, o que dificulta a quantificação de flavonoides totais via algumas técnicas de UV-Vis ou CLAE. Alguns açúcares estão comumente conjugados com flavonoides, como *D*-apiose; *L*-arabinose; *L*-ramnose; *D*-xilose; *D*-alose; *D*-galactose e *D*-glicose. Os flavonoides também podem estar associados a dissacarídeos e trissacarídeos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

As agliconas são, em geral, cristais amarelos solúveis em solventes orgânicos apolares. Os heterosídeos são, geralmente, solúveis em água e álcoois diluídos, mas insolúveis nos solventes orgânicos. A posição ocupada pela porção açúcar, o grau de insaturação e a natureza dos substituintes influenciam na solubilidade da molécula. A extração pode ser feita em etapas, considerando essas características de solubilidade como, por exemplo, primeiro o solvente apolar, para retirar outras substâncias apolares e facilitar a extração dos flavonoides; segundo o solvente pouco mais polar

(clorofórmio, acetato de etila) para extração das agliconas livres e, por fim, aumento da polaridade (acetona, metanol, água), para extração dos heterosídeos. Uma má estabilização na secagem pode levar a um falso teor de heterosídeo, pois as enzimas podem agir na hidrólise dos compostos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Assim como nos taninos, vários reagentes podem ser utilizados em ensaios colorimétricos preliminares (Reação de Shinoda, reativo de Wilson, Reação com H₂O₄, Reação de Marini-Bettolo). A técnica de CCD é importante na rotina laboratorial desses compostos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007), porém, métodos de espectrofotometria UV-Vis e CLAE são frequentemente desenvolvidos para análises quantitativas de controle de qualidade e, mesmo técnicas mais modernas, como espectrometria de massas e eletroforese capilar (HARBORNE; BOARDLEY, 1984; HASLER; STICHER, 1992; PIETTA; MAURI, 2001; LIANG et al., 2005; REPOLLÉS et al., 2006; GRAY et al., 2007; DENG et al. 2008; SOUZA et al., 2009; HAGHI; HATAMI, 2010; ZERAIK; YARIWAKE, 2010).

A espectrometria de massas já vem sendo utilizada na análise de flavonoides desde 1970, porém, em sistemas não integrados que incluem bombardeamento atômico rápidos (FAB-*Fast atom bombardment*), desorção de plasma (PD-*Plasma desorption*), ionização química (CI-*Chemical ionization*) e ionização de elétrons (EI-*Electron ionization*). Somente com a introdução das interfaces de termospray (TSP-*Thermospray*) e eletrospray (ESI-*Electrospray ionization*) que foi possível o acoplamento da espectrometria de massas com o cromatógrafo líquido (LC-*Liquid chromatography*) e permitiu o melhor emprego dessa técnica no estudo de diferentes plantas contendo flavonoides (PIETTA; MAURI, 2001).

Entre as funções dos flavonoides no vegetal, pode-se citar: proteção da incidência de raios solares, de insetos, fungos, vírus e bactéria; atividade antioxidante; controle hormonal; agentes alelopáticos e inibidores de enzima. Os flavonoides são utilizados farmacologicamente por apresentar atividade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, atividade no sistema cardiovascular e atividade estrogênica (HARBORNE; WILLIAMS, 2000). Além disso, os flavonoides são relevante economicamente, decorrente de suas propriedades como corante, alimentícia e farmacêutica (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007).

Foi comprovada a atividade fotoprotetora do extrato etanólico de *Culcitium reflexum* Kunth, atribuída à presença, principalmente, de flavonoides. O potencial antioxidante dos flavonoides apresenta-se como o principal mecanismo na fotoproteção por agir contra os danos oxidativos mediados pela radiação UV. No extrato etanólico de *C. reflexum* ambas as atividades, fotoprotetora e antioxidante, foram correlacionadas (AQUINO et al., 2002).

Os flavonoides estão relacionados à atividade antitumoral, principalmente dos cânceres hormônio-dependentes. Foi comprovado que os flavonoides de *Humulus lupulus* L. é um inibidor da enzima aromatase responsável pela síntese de estrogênio e, dessa forma, efetivos na prevenção de câncer de mama *in vitro* (MONTEIRO et al., 2007).

Tanee (2007) comprovou a atividade estrogênica do extrato acetato de etila das cascas de *Erythrina lysistemon* Hutch utilizando ratas ovariectomizadas. Essa ação foi vinculada a presença dos mais de 50 flavonoides conhecidos nessa espécie, sendo esta planta medicinal amplamente utilizada por mulheres para aliviar os sintomas da menopausa.

Os flavonoides também estão relacionados às atividades cardioprotetora (BAGCHI et al., 2003; ZERN et al., 2005), ação antiaterosclerose (ESTRUCH et al., 2004; GIEHL et al., 2007), antioxidante, hipolipidemia (HANSEN et al., 2005; CASTILLA et al., 2006; QIN et al., 2009), inibição da função plaquetária e aumento na liberação de óxido nítrico (KEEVIL et al., 2000; FREEDMAN et al., 2001; SHANMUGANAYAGAM; FOLTS, 2001; GASPER et al., 2014); hemostasia (JANSSEN et al., 1998) e anti-hipertensivo de produtos da *Vitis vinifera* L., seja o extrato das sementes, da casca, pelo suco ou vinho (MADEIRA et al., 2005).

Os flavonoides também são os responsáveis por aumentar a sensibilidade a insulina em paciente obesos insulino-resistentes (STULL, 2010) ou em modelos de ratos diabéticos (TAKIKAWA, et al., 2010; GUPTA et al., 2012); no tratamento de infecções urinárias (LAVIGNE et al., 2007); pelo efeito serotoninérgico e adaptogênico, incluindo neuroproteção, cardioproteção, antifadiga, antidepressão, ansiolítico e estimulante do rigor físico e mental de *Rhodiola rosea* L. (PANOSSIN et al., 2010; MANNUCCI et al., 2012). Além disso, há também a ação relacionada ao sistema nervoso central, sendo demonstrado o efeito da *Passiflora* sp. no tratamento da ansiedade (DENG et al., 2010) e ação dual protetiva para epilepsia (SINGH et al., 2012).

Similar aos taninos, os flavonoides apresentam alta capacidade antioxidantes. Hussein et al. (1987) demonstraram que flavonoides inibem a lipoperoxidação *in vitro* no estágio de propagação, atuando como bloqueadores das reações em cadeia provocadas pelos radicais hidroxila. Ensaio demonstraram que os flavonoides inibem a geração do ânion superóxido (O₂⁻) catalisado pela xantina oxidase. Os flavonoides sem grupos en-diol conjugados (ex. apigenina) inibiram a formação do ânion pela inibição competitiva, enquanto que os flavonoides com grupo en-diol conjugado (ex. luteolina) inibiram a formação de ácido úrico pela redução da enzima catalase (MASUOKA et al., 2012).

Rice-Evans et al. (1997) revisaram a literatura referente à relação estrutura-atividade antioxidante de flavonoides e ácidos fenólicos e verificaram que a insaturação no anel C (presente na quercetina) é importante para uma melhor atividade antioxidante comparado ao Trolox (que reflete a habilidade do composto doar hidrogênio para a quelação de radicais cátions) quando comparado com estrutura com o anel heterocíclico saturado (presente na catequina); o grupo hidroxila na posição 3, conjugado com a dupla ligação 2-3, é importante para a atividade antioxidante, uma vez que há diminuição significativa dessa atividade quando essa hidroxila é bloqueada ou removida; a dupla ligação 2-3 não é tão efetiva na doação de hidrogênio quando não há hidroxilas substituídas na posição ortodifenólica do anel B; estruturas dihidroxiladas no anel B é mais ativo que as monohidroxiladas; ésteres de (epi)galocatequinas são mais ativos do que a (epi)catequina.

Pesquisas vêm demonstrando a ação de flavonoides, principalmente isoflavonas, sobre o sistema hormonal por teste *in vitro*, que sugere efeito sobre a reposição óssea, redução de eventos cardíacos e risco de câncer de mama pós-menopausa. As isoflavonas demonstram atividade fraca sobre receptores de estrogênio (RE), sendo de 5 a 20 vezes com maior afinidade pelo RE- β do que o RE- α (KURUTO-NIWA et al., 2007); extrato de *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. apresenta atividade estrogênica leve pela avaliação *in vitro* de levedura recombinante (*Saccharomyces cerevisiae* com a sequência do DNA do RE- α humano) (BOLLE et al., 2007); outro estudo com proliferação de MCF-7 demonstrou que esta antagoniza o efeito proliferativo do estrógeno, sugerindo uma ação antiestrogênica (ZIERAU et al., 2002); extrato de própolis apresentou efeito estrogênico pela proliferação celular de MCF-7 e efeito uterotrópico positivo em ratas Wistar imaturas (SONG et al., 2002); flavonoides de *Mucuna sempervirens* Hemsl. apresentaram atividade estrogênica em células MCF-7 (DU; LI, 2012). Isoflavonas e outros flavonoides também interferem no sistema hormonal via inibição de 3β -HSD tipo II (3β -hidroxiesteroide desidrogenase acoplada a Δ^5 - Δ^4 isomerase) que é uma enzima chave para a biossíntese dos hormônios esteroidais (OHNO et al., 2004). Flavonoides também podem afetar a metabolização de progesterona pelo fígado, inibindo a redução de progesterona em 20α -hidroxiprogesterona pela forte inibição da enzima 20α -hidroxiesteroide desidrogenase (SHIMADA et al., 2005; SHIMADA et al., 2006).

2.3 ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA E PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE MISTURAS

O planejamento estatístico de experimentos foi primeiramente tratado por Fischer em 1958 e é extremamente útil para planejar experimentos, de forma a avaliar os parâmetros que influenciam determinadas características de interesse, realizando o menor número de experimentos necessários para um resultado confiável (TYE, 2004). O planejamento estatístico pode ser dividido em dois temas, o primeiro, análise fatorial, refere-se quando o problema em questão é influenciado por fatores do processo, tais como temperatura, pressão, tempo, entre outros. O segundo, planejamento de misturas, aplica-se quando a preocupação está na preparação ou modificação de misturas (ERIKSSON et al., 1998). Foi Scheffé (1958; 1963) quem tratou da teoria envolvendo misturas, em que considera-se a misturas de q componentes cuja finalidade é a previsão empírica da resposta a qualquer mistura dos componentes, quando esta depende apenas da proporção dos componentes e não da quantidade total. Ou seja, as propriedades de uma mistura depende da proporção de seus componentes e a soma de suas proporções é sempre 100%, assim, cada componente da mistura não é independente (BARROS NETTO et al., 2007).

Dessa forma, em uma mistura de q componentes ($q \geq 3$), na qual x_i é a proporção (em volume ou em peso, por exemplo) do constituinte i na mistura, temos:

$$x_i \geq 0 \quad (i = 1, 2 \dots q) \qquad x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1$$

Essa condição essencial, introduz algumas diferenças em relação aos planejamentos experimentais convencionais. Entre elas, não se pode descrever as regiões de contorno da mistura em termos de quadrados ou cubos, mas normalmente em termos de triângulos. Outra diferença é que os termos de uma mistura não podem ser analisados separadamente pelo método clássico de regressão linear múltipla, porém deve-se aplicar métodos de análise de variáveis (ERIKSSON et al., 1998).

O espaço experimental para misturas de dois componentes terá a limitação $x_1 + x_2 = 1$, isso significa que todas as possíveis misturas desses dois componentes podem ser representados pelos pontos sobre uma reta, assim como está representado na Figura 6. De forma similar, todas as misturas possíveis de 3 componentes ($x_1 + x_2 + x_3 = 1$) podem ser representados por pontos dentro de um triângulo equilátero, no qual os vértices correspondem aos componentes puros, as arestas às misturas binárias e os pontos situados no interior do triângulo representam misturas dos três componentes. Mistura com 4 componentes ($x_1 + x_2 + x_3 + x_4 = 1$) é representado pelos pontos dentro de um tetraedro, no qual, as faces correspondem a misturas ternárias e os pontos no interior do tetraedro, as misturas quaternárias (BARROS NETO et al., 2007).

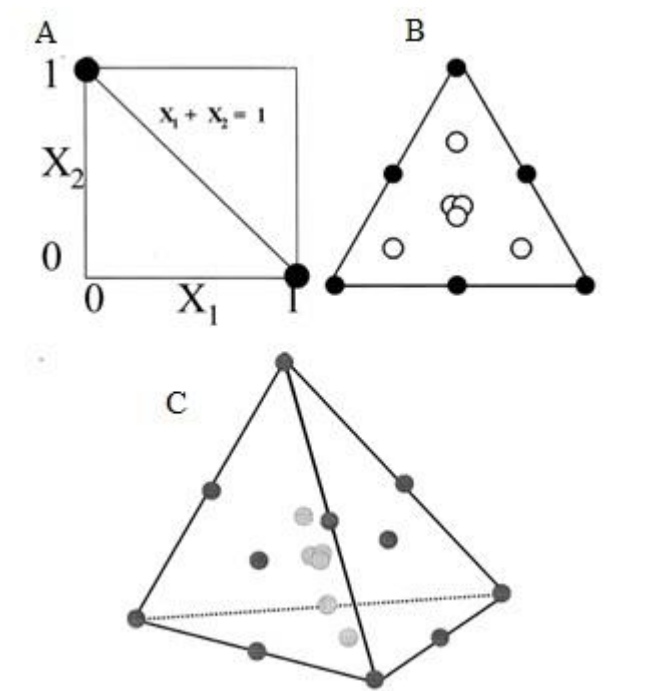


Figura 6: O espaço experimental para misturas de dois (A), três (B) e quatro (C) componentes, respectivamente (ERIKSSON et al., 1998).

Em planejamento estatístico é interessante realizar o menor número de experimentos necessários para um resultado confiável. Para planejamentos de misturas com q componentes, o número de experimentos necessários é igual a $2^q - 1$ (SCHEFFÉ, 1963). Sendo assim, para um

planejamento com 4 componentes, teremos 15 experimentos, sendo 4 misturas de componentes puros, 6 misturas binárias, 4 misturas ternárias e 1 mistura quaternária.

A investigação das propriedades de uma mistura inicia-se postulando um modelo para descrever como uma determinada propriedade de interesse varia em função da composição da mistura. Após a realização dos experimentos, os dados obtidos são coletados e um polinômio com um número de termos a estimar, que pode ser no máximo igual ao número de pontos do planejamento, é ajustado. Os modelos para misturas contendo mais de três componentes são simples extensões dos modelos para três componentes. Para o caso geral de q componentes, os modelos linear, quadrático e cúbico especial são dados respectivamente por:

$$\hat{y} = \sum_{i=1}^q b_i^* x_i$$

$$\hat{y} = \sum_{i=1}^q b_i^* x_i + \sum_{i<j}^q \sum_j^q b_{ij}^* x_i x_j$$

$$\hat{y} = \sum_{i=1}^q b_i^* x_i + \sum_{i<j}^q \sum_j^q b_{ij}^* x_i x_j + \sum_{i<j<k}^q \sum_{j<k}^q \sum_k^q b_{ijk}^* x_i x_j x_k$$

Onde b_i representa a resposta esperada para o componente puro i e é chamado de coeficiente linear do componente i , b_{ij} é o coeficiente de interação entre os componentes i e j , chamado de coeficiente binário, o termo b_{ijk} é o coeficiente de interação entre os componentes i, j e k , chamado de coeficiente ternário. Os termos de interação de um modelo indicam, quando positivos, efeitos sinérgicos e, quando negativos, efeitos antagônicos dos componentes da mistura. O planejamento experimental para a determinação dos coeficientes do modelo cúbico especial é chamado de centroide simplex. A variação de uma dada propriedade, com a composição da mistura pode ser descrita por uma superfície de resposta representada por suas curvas de nível (BARROS NETO et al., 2007).

Deve-se testar se o modelo é ajustado para os dados obtidos, assim, testa-se o modelo linear, caso haja falta de ajuste, segue-se para o modelo quadrático e, posteriormente para o modelo cúbico especial. A significância estatística desses modelos devem ser avaliadas com uma análise de variância (ANOVA), na qual, o modelo melhor ajustado é aquele que é significativo e não apresenta falta de ajuste (BARROS NETO et al., 2007).

Caso o modelo seja válido pode-se prever as propriedades de uma mistura qualquer sem ter necessitado realizar mistura alguma. Para se testar a qualidade do ajuste do modelo, realizando-se um experimento probatório, ou seja, um experimento com uma mistura de componentes que não foi utilizado para o desenho do modelo e, assim, compara-se o resultado obtido experimentalmente com o valor predito pelo modelo definido (BARROS NETO et al., 2007).

A análise de um grande número de medidas, como as obtidas pelo planejamento estatístico de misturas, pode ser conduzida de forma objetiva pela aplicação de métodos quimiométricos, que podem

reduzir o número de medidas para tornar mais fácil a interpretação e visualização dos dados (BARROS NETO et al., 2002). O objetivo dos métodos multivariados classificados como aprendizagem não supervisionada (dentre eles, a análise de componentes principais e a análise de agrupamentos hierárquica) é encontrar agrupamentos naturais das amostras num espaço p-dimensional sem a utilização de informações a respeito das classes existentes entre as amostras.

A análise de componentes principais (PCA – *Principal Component Analysis*) é, dentre os métodos quimiométricos, a ferramenta mais frequentemente usada. O seu objetivo é reduzir a dimensão do conjunto de dados, detectar amostras anômalas, selecionar variáveis e fazer modelagem de classificação, enquanto simultaneamente retém a informação contida nos dados (HAIR et al., 2009). A PCA transforma as variáveis originais em novas variáveis chamadas de componentes principais, no qual cada uma representa a combinação linear das variáveis originais. O modelo de uma componente principal no espaço de p-variáveis corresponde a uma reta, que deve passar pelo ponto central da representação do conjunto dos dados. Sua direção é determinada de modo que os desvios sejam os menores possíveis. A primeira componente principal definida explica o máximo de informação estatística, porém, se uma reta não for suficiente para descrever os dados, adiciona-se uma segunda componente principal, que é perpendicular a primeira e contém a maior variância dos pontos nesta direção. Este procedimento pode ser repetido até p vezes, quando os erros residuais se tornam iguais a zero (SCARMINIO, 1989; BEEBE et al., 1998).

Para auxiliar na interpretação da PCA, os eixos das componentes principais podem ser rotacionados. A rotação varimax, aplicada neste trabalho, gira rigidamente os eixos dos fatores, de modo que eles se aproximem o máximo dos vetores mais divergentes. Este procedimento maximiza a variância dos pesos dos fatores em cada vetor, sob a restrição de que os fatores permaneçam ortogonais (SENA et al., 2001).

A análise de agrupamentos hierárquica (HCA – *Hierarchical Cluster Analysis*) é um grupo de técnicas multivariadas com a finalidade de agregar objetos com base nas suas características, ou seja, classifica objetos de acordo com a semelhança. O método avalia as distâncias entre as amostras com base na informação das variáveis medidas, revelando os agrupamentos naturais existentes no conjunto de dados. Os agrupamentos resultantes de objetos exibem elevada homogeneidade interna (dentro do agrupamento) e elevada heterogeneidade externa (entre os agrupamentos). Graficamente, a hierarquia pode ser representada na forma de um gráfico bidimensional chamado dendograma, no qual as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas são agrupadas entre si. Dentre os algoritmos utilizados na análise de agrupamentos, o método de Ward foi aplicado neste trabalho. Este método, a similaridade entre dois agrupamentos não é uma única medida de similaridade, mas a soma dos quadrados dentro dos agrupamentos feita sobre todas as variáveis. Esse procedimento tende a combinar agrupamentos com um pequeno número de observações, pois a soma de quadrados é diretamente relacionada com o número de observações envolvidas e, portanto, os padrões de

agrupamento refletem agregados com aproximadamente o mesmo tamanho (BEEBE et al., 1998; HAIR et al., 2009).

Tendo em vista a objetividade de planejamento estatístico de mistura e a possibilidade de otimização de vários fatores, essas análises têm sido aplicadas em diversos campos, como na ciência, tecnologia e, particularmente, na indústria. Martinello (2005) utilizou planejamento de misturas para determinar composição de um comprimido de paracetamol por compressão direta com parâmetros de qualidade adequados. Soares (2010) avaliou a seletividade do processo extrativo de *Erythrina speciosa* Andrews pela mistura de 4 solventes. Ojoe (2008) obteve três formulações de comprimidos de liberação prolongada de teofilina com as características desejadas pelo planejamento estatístico de misturas de três matrizes hidrofílicas. Miglioranza (2012) utilizou o planejamento estatístico de misturas com três componentes para determinar a melhor extração de lactonas sesquiterpênicas de *Arnica montana* L. em uma formulação farmacêutica em gel no preparo da amostra para teste de teor por CLAE. A utilização de planejamento de misturas para a otimização de métodos cromatográficos como a composição da fase móvel também é possível e foi determinada para *Camellia sinensis* (L.) Kuntze visando a otimização do perfil cromatográfico (BORGES et al., 2007; FERREIRA et al., 2007). Seabra et al. (2012) avaliaram a influência de 3 componentes na extração em fluido supercrítico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. Diciaula (2012) avaliou o conteúdo de polifenóis totais presente em extratos de *Schinus terebinthifolius* Raddi produzidos pelo planejamento de misturas ternárias, assim como Lonni et al. (2011) planejaram uma mistura quaternária para a extração de componentes das cascas de *Trichilia catigua* A. Juss e avaliaram parâmetros de qualidade como rendimento, teor de polifenóis e atividade antioxidante. De forma similar, Garcia et al. (2010) avaliaram as características de extratos de *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker produzido pelo planejamento estatístico de misturas por 5 componentes.

2.4 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

2.4.1 *Enterococcus*

Os *Enterococcus* são bactérias Gram-positivas, cocos ovais, anaeróbios facultativos que formam cadeias. A temperatura ótima para seu desenvolvimento é 35 °C, mas possuem habilidades de sobreviver a condições adversas, como temperaturas de 10 a 60 °C, podendo resistir a altas concentrações salina e a uma ampla variação de pH, até 9,6 (MURRAY, 1990). Por muito tempo foram considerados pertencentes ao gênero *Streptococcus*, somente em 1984 que foi caracterizado o gênero *Enterococcus* que, atualmente possui 54 espécies (EUZÉBY, 2016). Os enterococos são comensais e estão presentes no trato gastrointestinal de seres humanos (representando 1% da microflora intestinal), assim como de outros animais, bem como em outros tecidos (FRANZ et al., 1999; POETA et al., 2005; SGHIR et al., 2000).

Os enterococos tinham pouca importância, por terem baixa virulência e reduzido impacto clínico, mas desde os anos de 1980 vem emergindo rapidamente como uma das principais bactérias patogênicas à ameaça hospitalar, sendo que 85% a 90% das infecções enterocócicas são causadas pelo *E. faecalis* e 10% pelo *E. faecium* (LECLERCQ, 2009; MURRAY, 2000). Além disso, os enterococos tem grande relevância como reservatórios de genes de resistências a muitos agentes antimicrobianos, que podem ser transferidos para outros microrganismos mesmo pertencentes a gêneros diferentes (FRANZ et al., 1999).

A resistência dos enterococos se deve a vários fatores, dentre eles, a maior resistência a antibióticos, a presença de facilitadores da sua adesão em células e matriz extracelular do hospedeiro (como proteínas e adesinas); habilidade de colonizar o trato intestinal, seu habitat natural, assim como de aderir a outros epitélios, como o trato urinário, canal vaginal e cavidade oral, entre outros e, além disso, à sua capacidade de formar biofilmes, que facilita a sua adesão a superfícies inertes (FRANZ et al., 1999; THOMAS et al., 2009). As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são agentes de diversas infecções, tais como bacteriemia, sepse, endocardite, infecção do trato urinário, infecções de feridas e meningite neonatal (MURRAY, 1990).

A resistência de bactérias a agentes microbianos é conferida pela presença de genes de resistência que podem estar localizados no cromossoma bacteriano ou em elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transposons ou integrons, e podem ser pré-existentes ou proveniente de mutações genéticas. Em geral, o mecanismo de resistência é baseado em quatro princípios principais: modificação química de antibiótico com perda da sua atividade; alteração do sítio-alvo do antibiótico; alteração na permeabilidade da membrana bacteriana; ou remoção do antibiótico por um tipo de bomba de efluxo (SÁNCHEZ, 2006).

De tal forma, a resistência de enterococos a agentes antimicrobianos pode ser classificada em intrínseca e adquirida. Eles são intrinsecamente resistentes, por apresentarem genes cromossomais determinantes dessa resistência, a vários antibióticos, como cefalosporinas, a níveis baixos de beta-lactâmicos (penicilínicos), aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) e clindamicina. Possuem resistência adquirida à eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina, além de elevadas concentrações de beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, clindamicina e glicopeptídeos (vancomicina), que é oriunda por meio de mutações cromossomais ou aquisição de novos genes em elementos móveis (MURRAY, 1990).

Devido a sua resistência intrínseca, o tratamento de enterococos consiste na combinação sinérgica de um antimicrobiano com ação sobre a parede celular, como um glicopeptídeo ou beta-lactâmico, com um aminoglicosídeo, para se facilitar a entrada deste antimicrobiano na célula enterocócica e proporcionar sua morte (MURRAY, 1990). A vancomicina é um glicopeptídeo indicado para o tratamento de infecções graves como endocardites, osteomielites e sepses (MALATHUM; MURRAY, 1999; MURRAY, 2000). Com a combinação de resistência intrínseca

com resistência adquirida, as opções de tratamento para infecções causadas por VRE são extremamente limitadas (BRUIN; RILEY, 2007). Alternativas terapêuticas para essas infecções são restritas a antibióticos introduzidos recentemente na prática clínica, tais como linezolid, tigeciclina e daptomicina. Contudo, estas medicações são aprovadas apenas para certas indicações e já tem sido relatada resistência para algumas delas (LECLERCQ, 2009). Vale ressaltar que o crescente aumento da resistência bacteriana, está ligada a vários fatores, dentre eles, o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos, que eliminam bactérias suscetíveis, proporciona a emergência e disseminação de bactérias resistentes e também de genes de resistência microbiano (FRANZ et al., 1999). Além disso, tem-se notado que o uso crescente de vancomicina no tratamento de MRSA tem resultado em um aumento significativo de VRE (BRUIN; RILEY, 2007).

Com relação a VRE já existem vários fenótipos de resistência a vancomicina caracterizados, sendo os mais frequentes a *vanA* e *vanB*, que estão localizados em um transposon normalmente associado a um plasmídeo (CATTOIR; LECLERCQ, 2013). Em estudo recente foi mostrado que genes de resistência à vancomicina surgiram antes do uso dos antimicrobianos: os genes *vanHAX* foram recuperados de uma amostra de solo sedimentado recolhido no Canadá com mais de 30.000 anos. Isso favorece a teoria de que os antibióticos selecionam os microrganismos com resistência pré-existente (D’COSTA et al., 2011).

Os primeiros relatos de VRE surgiram em 1988 em alguns países da Europa, nos quais se observou uma forte prevalência, em especial da espécie *E. faecium* (VRE_{fm}), na comunidade e casos raros em hospitais. Este fato é atribuído principalmente à transmissão de VRE para humanos pela cadeia alimentar e, essa prevalência ao uso de avoparcina (antibiótico glicopeptídeo) como promotor de crescimento em animais criados em confinamento para a indústria alimentícia. A avoparcina foi usada pela primeira vez com essa finalidade em 1975 e proibida em 1997, assim como de outros antimicrobianos glicopeptídeos, como promotor de crescimento pela União Europeia, entretanto, os determinantes de resistência ainda persistem (BOGAARD; STOBBERINGH, 2000). Porém, é importante destacar que enterococos podem sobreviver em condições adversas podendo ser encontrados em outros nichos como solo, água, plantas e alimentos (EATON; GASSON, 2002). Por outro lado, nos EUA, onde o uso de avoparcina nunca foi legalmente permitido em animais destinados ao consumo alimentar, a vancomicina foi amplamente utilizada no tratamento humano e, o primeiro caso de VRE_{fm} foi registrado em 1989 no meio hospital, e se tornou o principal aspecto de preocupação nosocomial (FRIEDEN et al., 1993).

No Brasil, a utilização de avoparcina foi proibida em 1998, porém outros antimicrobianos ainda são permitidos para uso em animais para a alimentação (BRASIL, 2016). No entanto, nota-se que o maior foco de VRE tem sido no ambiente hospitalar, sendo que o primeiro caso registrado ocorreu em 1996 no Paraná (COSTA et al., 1998) e, em seguida, em 1997 em São Paulo (ZANELLA

et al., 1999). Diversos trabalhos tem confirmado a disseminação de VRE no Brasil, principalmente no meio hospitalar.

No hospital universitário de Londrina, no Paraná, foi avaliado o perfil genético de resistência de isolados VRE_{fm} (GOMES, 2013), assim como a prevalência de diferentes espécies do gênero *Enterococcus*, não apenas de isolados hospitalares, mas também em amostras de queijos (ROCHA, 2012). No interior de São Paulo, constatou-se que 122 pacientes de dois hospitais adquiriram VRE durante o período de internação, sendo que 86,9% foram caracterizados com *E. faecium* e 13,1%, *E. faecalis*. Fatores de riscos foram correlacionados com o desenvolvimento de infecções (CORREA, 2014). Na capital paulista verificou-se a presença de VRE no ambiente hospitalar com a presença do gene *vanA* (SACRAMENTO, 2015). Na unidade intensiva do hospital universitário de Uberlândia, verificou-se a presença de VRE, com predominância do fenótipo *vanC* (gene cromossomal) e, embora haja pouca importância clínica, há grande preocupação por serem reservatórios de gene de resistência (BATISTÃO, 2010). Posteriormente, verificou-se a frequência de VRE_{fm} em 92% dos 171 pacientes avaliados, sendo que 12,9% desenvolveram infecções por VRE, geralmente urinárias (72%) (CAMPOS, 2013). Na região Norte do país, onde há uma menor frequência de dados publicados, verificou-se a presença de três isolados de *E. faecium* e um de *E. faecalis* resistentes a vancomicina pelo gene *vanA*, de um total de 38 isolados enterocócicos analisado provenientes de hospitais da cidade de Manaus (AZEVEDO, 2013). Na cidade de Natal, avaliaram-se isolados de 116 pacientes com quadros infecciosos, dos quais 91,4% eram *E. faecalis*, destes sendo 58,2% resistente a tetracilina e 36,7% a estreptomicina. Somente um caso de resistência a vancomicina foi detectado em uma amostra de *E. faecium*, sendo este o primeiro caso de VRE no Estado do Rio Grande do Norte (COSTA, 2012). A avaliação de 203 isolados de *Enterococcus* sp. de hospitais em Porto Alegre demonstrou a prevalência de *E. faecalis* (93,6%) e a baixa resistência a antimicrobianos como ampicilina (2,5%), vancomicina (0,5%) e teicoplanina (0,5%) e a moderada resistência a gentamicina (23,6%) e estreptomicina (37,4%) (BENDER, 2008). Porém, outro estudo constatou a presença de 34% de VRE em 317 isolados hospitalares na mesma cidade (SANDRI, 2004).

Preocupação também crescente no meio odontológico com a presença de enterococos na cavidade bucal, relacionado à dificuldade de tratamento endodôntico. Em avaliação da saliva de 240 pacientes, observou-se a presença de enterococos em 16,6%, com diferentes perfis de resistência, sendo 12% VRE (KOMIYAMA, 2008). A análise de isolados de 38 canais radiculares apresentou 58% de prevalência de enterococos, dos quais 27% foram resistentes a diferentes antimicrobianos de uso odontológico (SANTOS, 2014).

Além da prevalência hospitalar e na comunidade, destaca-se que os enterococos são bem distribuídos no ambiente (solo, areia, ambientes aquáticos) e devido a sua presença em fezes de animais e humanos, são usados como indicadores de contaminação para se determinar a qualidade da água (BYAPPANAHALLI et al., 2012). Ambientes aquáticos contaminados podem ser usados para a

captação de água para o consumo, para atividades agrícolas e de recreação podendo levar a contaminação por enterococos (LEENER et al., 2005). A presença de VRE foi verificada em amostras coletadas das superfícies de rios urbanos da cidade de São Paulo, assim como na carne de frango comercializada, sendo que o perfil de resistência foi distinto, porém todas as amostras foram identificadas com o gene *vanA* (SACRAMENTO, 2015). Analisando o perfil de resistência do gênero *Enterococcus* na cadeia alimentar, obtiveram-se 167 isolados enterococos da carne de frango e 127 de leite pasteurizado comercializados no Rio de Janeiro e observou o predomínio de *E. faecalis* (62,6%), resistência a vários antimicrobianos e inclusive multirresistência, no entanto, nenhuma amostra apresentou resistência a glicopeptídeos (FRACALANZZA, 2007). Diferentes pontos da Lagoa dos Patos-RS foram avaliados apresentando enterococos, que indicam os níveis de degradação ambiental devido a carga de poluição fecal recebida. Destaca-se que o *L. brasiliense* coletado para este trabalho é oriundo das margens da Lagoa dos Patos, próximo da Praia do Cassino, ponto que apresentou baixa contagem de enterococos (HENKES, 2010).

2.4.2 *Staphylococcus*

Staphylococcus são cocos Gram-positivos em forma de cachos, anaeróbios facultativos, tolerantes a altas concentrações de NaCl, com temperatura ótima de crescimento de 37 °C, são imóveis e não formam esporos ou encapsulam. Estes microrganismos são comumente encontrados na pele, glândulas cutâneas e membranas mucosas de aves e mamíferos, normalmente em uma relação simbiótica. No homem, são comuns na nasofaringe, perineo e pele. São relatadas 52 espécies pertencentes a este gênero. O *S. aureus* é considerado um dos principais patógenos humanos, sendo responsável por processos infecciosos agudos, assim como complicações causadas por suas toxinas. É uma bactéria de grande importância em infecções hospitalares, devido ao seu caráter oportunista, sua virulência intrínseca, capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais, sendo frequente em sítios cirúrgicos, pneumonia e infecções sistêmicas (EUZÉBY, 2016; LOWY, 2003; SANTOS et al., 2007).

Antes da descoberta dos antibióticos, a mortalidade entre pessoas com bacteremia estafilocócica era em torno de 80%. O advento dos antibióticos mudou drasticamente este cenário, sendo que nos anos de 1940, a maioria dos *S. aureus* era sensível à penicilina. Porém, na década de 1960, 90% dos *S. aureus* já apresentavam beta-lactamases (BRAKSTAD; MAELAND, 1997; CHAMBERS, 1988; LOWY, 2003). A metilina (um derivado semissintético da penicilina, não degradada pelas beta-lactamases) foi a opção de tratamento a Gram-positivos introduzida na década de 1960, mas no mesmo ano do seu lançamento, já haviam cepas de MRSA. Então surgiram as quinolonas, como a fluoroquinolona, que era inicialmente utilizada para bactérias Gram-negativas e foram aplicadas contra cepas MRSA, mas logo surgiram cepas resistentes por mutações cromossômicas espontâneas. A década de 1980 é marcada pela emergência de MRSA, apesar do

grande número de antibióticos disponíveis, a mortalidade por bacteremia estafilocócica permanecia entre 20 a 40%. A opção de tratamento foi o uso de glicopeptídeos, como a vancomicina, porém isso levou à emergência também de cepas *S. aureus* resistentes a vancomicina, assim como de *Enterococcus* (AYLIFFE, 1997; LOWY, 2003).

A resistência a beta-lactâmicos é devida, principalmente a dois mecanismos, a produção de enzimas denominadas beta-lactamases que inativam o antibiótico pela quebra do anel beta-lactâmico e, à baixa afinidade da proteína ligadora de penicilina. O mecanismo de resistência a meticilina está relacionado a essa baixa afinidade das proteínas ligadoras de penicilina, que é codificada pelo gene *mecA*. Este faz parte de um elemento móvel, que é parte integrante de um elemento genômico denominado “cassete cromossômico estafilococos *mec*”-SCC*mec* (LECLERCQ, 2009; LOWY, 2003).

A principal preocupação inerente a *S. aureus*, é relacionada ao meio hospitalar, entretanto, cepas de MRSA isoladas na comunidade vem sendo cada vez mais frequentes, sendo relacionadas a infecções cutâneas e de tecidos moles em pessoas jovens e saudáveis (GELATTI et al., 2009; LECLERCQ, 2009; UHLEMANN et al., 2014).

No Brasil, alguns estudos demonstram a problemática hospitalar com MRSA. Na unidade intensiva do hospital universitário de Uberlândia, verificou-se também a presença de MRSA e, embora tenha havido baixa frequência de colonização (5,1%), observou-se uma alta taxa de evolução para quadros infecciosos (23,5%) (BATISTÃO, 2010). Em hospital universitário de Presidente Prudente, verificou-se que 54,3% dos pacientes com infecções estafilocócicas apresentavam cepas MRSA. A investigação em colaboradores assintomáticos, por coletas nas mãos e narinas, demonstrou uma prevalência de 27% de *S. aureus* sensíveis a meticilina e 4% de MRSA (BRAOIOS, 2005). Isolados de *S. aureus* provenientes de cateteres vasculares central de pacientes do hospital universitário do Triângulo Mineiro, foram avaliados e 94,7% apresentaram resistência a penicilina, 86,8% a ampicilina, 1 amostra a vancomicina e 46,7% a oxacilina, sendo que desta, o gene *mecA* pode ser detectado em pelo menos 91% (FARIA, 2008). Isolados estafilococos de 46 amostras do hospital universitário de Recife demonstrou a relação de cepas MRSA e sua capacidade de formar biofilme, o que confere à bactéria a capacidade de aderir e colonizar materiais inertes e proteção contra defesas do hospedeiro e antimicrobianos, contribuindo com seu potencial de resistência e disseminação (OLIVEIRA, 2009).

2.4.3 Klebsiella

Klebsiella são bacilos Gram-negativos com característica ausência de motilidade e capsulados. Seu habitat natural é o solo e água, e podem ser colonizadores do trato gastrointestinal, olhos, vias respiratórias e sistema genitourinário. Atualmente, o gênero possui 15 espécies, sendo a *Klebsiella pneumoniae* a de maior relevância humana por ser associada, principalmente, à pneumonia, mas

também podendo causar infecções em outros sistemas como trato urinário e sistema nervoso central (ALMEIDA, 2015; EUZÉBY, 2016).

Os carbapenêmicos, tais como imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem, são antibióticos β -lactâmicos com amplo espectro de atividade e agem inibindo a síntese da parede bacteriana pela ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilina. São considerados um dos poucos antibióticos ativos contra enterobactérias resistentes a β -lactâmicos, pois são resistentes à degradação da maioria das β -lactamases e apresentam elevada afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina e excelente permeabilidade na membrana externa. Estes antibióticos têm sido considerados terapia de escolha pela sua estabilidade, espectro de ação, poucos relatos de resistência e alta tolerância pelos pacientes. Entretanto, nos últimos 20 anos, os índices de resistência aos antibióticos carbapenêmicos têm aumentado proporcionalmente ao seu uso, como uma resposta adaptativa das bactérias (PAVEZ, 2009).

Carbapenemases são enzimas β -lactamases capazes de hidrolisar antibióticos carbapenêmicos. Dentre os grupos de carbapenemases, o de maior importância é o grupo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC), chamado dessa forma por ter sido descoberto inicialmente em cepas de *K. pneumoniae*, e apesar de serem muito frequentes nesta bactéria, tem sido relatada também em diversas outras enterobactérias. Isto demonstra a grande capacidade de disseminação dos determinantes de resistência, associada a sua localização plasmidial ou à presença de elementos móveis de resistência (PAVEZ, 2009).

KPC foi originalmente identificada nos Estados Unidos da América em 1996, e em cerca de uma década depois, bactérias produtoras de KPC já haviam sido identificadas em todos os continentes com alto índices de mortalidade (chegando a 67% dos pacientes KPC-positivos). Surtos hospitalares de *K. pneumoniae* produtora de KPC estão presentes em todos os continentes o que é de grande preocupação epidemiológica, sendo as infecções mais frequentes no trato digestivo inferior (32%), trato urinário e corrente sanguínea (24%), trato respiratório inferior (21%) e sítios cirúrgicos (10%). No Brasil, o primeiro caso reportado foi em 2006 em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes em unidades hospitalares de tratamento intensivo. Os surtos de infecções por *K. pneumoniae* produtoras de KPC estão intimamente relacionados ao contato e, medidas preventivas básicas, enfatizando a higienização das mãos, podem contribuir para o controle desses surtos (CAMPOS et al., 2016; HOXHA et al., 2016; KATSIARI et al., 2015; KOFTERIDIS et al., 2014; MUNOZ-PRICE et al., 2013; NY et al, 2015; WALKER; SHANKARAN, 2016).

O gênero *Klebsiella* é um importante agente em infecções adquiridas em unidades de tratamento intensivo neonatal, frequentemente causador de sepse, meningites, infecções urinárias, pneumonia e infecções articulares. Em um estudo retrospectivo sobre a prevalência de cepas resistentes a carbapenêmicos, verificou-se que 2,6% dos pacientes pediátricos adquiriram infecções em unidades de tratamento intensivo neonatais, sendo destes, 3,6% causadas por cepas de *K.*

pneumoniae resistentes a carbapenêmicos e a mortalidade deste grupo foi de 16,6%. Fatores de riscos independentes foram associados às infecções, tais como doenças metabólicas, uso prévio de antibióticos carbapenêmicos e procedimentos cirúrgicos prévio (AKTURK et al., 2016). No Brasil, Almeida (2005) verificou a taxa de infecções hospitalares e a identificação de *Klebsiella* chegou a 30% como taxa geral e em torno de 10% em unidades neonatais. A mortalidade em neonatos foi de 11%, sendo todos portadores de cepas multiresistentes.

2.4.4 Perspectivas de novas drogas

Entre os anos de 1940-1960 vários antibióticos foram descobertos por triagens de produtos naturais antimicrobianos e entre os anos 1960 a 1980 surgiram os primeiros antibióticos semissintéticos. Os anos de 1940 a 1970 foram o ‘período de ouro’ do descobrimento de novos antibióticos, tanto naturais como sintéticos (SILVER, 2011). Com o uso excessivo de antibióticos, especialmente penicilina, desde 1942, cepas resistentes começaram a emergir e a se tornar um grave problema hospitalar. Já no início da década de 1970, teve-se que abandonar a crença de que todas as infecções bacterianas eram tratáveis e aos poucos a resistência a multidrogas se tornou uma regra entre determinados microrganismos, tais como estafilococos, enterococos e pneumococos (LOWY, 2003). Nos anos seguintes, uma grande desaceleração no desenvolvimento de novos antibióticos pode ser observada. A partir de 1980, a genôma e a triagens de coleções de compostos passaram a ser usadas na busca por novos antimicrobianos e, a partir de 2000, poucas drogas foram introduzidas como novas opções de tratamento (GUIMARÃES et al., 2010; SILVER, 2011).

Opções terapêuticas para patógenos resistentes a multi-drogas são extremamente limitados. A busca por novas drogas, a partir de outros microrganismos e de metabólitos secundários de plantas medicinais, se torna cada vez mais importante. Várias investigações tem proposto que polifenóis têm um potencial efeito contra MRSA incluindo a possibilidade de uso em combinações com antibióticos a fim de potencializar sua eficácia, diminuir a dose antibiótica, e assim reduzir seus efeitos adversos (DAGLIA, 2012; HATANO et al., 2005; MCDONALD et al., 1997; NAGOSHI et al., 2006).

Os metabólitos secundários, presentes em plantas, microrganismos e, em menor escala, em animais, são de grande interesse para a medicina e indústria farmacêutica, devido a sua grande variedade de atividades biológicas (SANTOS, 2007). A maior parte dos antibióticos em uso clínico são provenientes do metabolismo secundário microbiano ou são seus derivados semissintéticos (GUIMARÃES et al., 2010). Por outro lado, cerca de 25 a 50% dos produtos farmacêuticos comercializados são fitoterápicos ou tiveram origem em plantas medicinais, no entanto, são praticamente inexistente suas indicações como antimicrobianos. Várias classes de compostos de origem vegetal tem sido amplamente reportadas com efeito antibacteriano, dentre elas, estão as substâncias fenólicas e polifenólicas, como as quinonas, flavonoides e taninos. A ação antibacteriana de taninos é relacionada a sua capacidade de complexação com proteínas, seja por pontes de

hidrogênio ou ligações covalentes, inativando as adesinas, enzimas e proteínas envolvidas no transporte microbiano, normalmente localizadas na parede celular. É importante ressaltar que além da grande diversidade de substâncias biologicamente ativas de origem vegetal, o interesse da população por estes antimicrobianos também é crescente, devido à conscientização dos problemas com a prescrição excessiva e uso indevido de antibióticos tradicionais (COWAN, 1999).

Pesquisas têm reportado a ação de produtos naturais contra Gram-positivos, entretanto, parece ser poucos que reportam a ação contra cepas resistentes. As folhas de *Cinnamomun* sp., tradicionalmente utilizado para infecções cutâneas, demonstrou relativa atividade *in vitro* contra cepas MRSA (MIC=19,5 µg/mL) (BURU et al., 2014). Em uma triagem com extratos de 10 diferentes plantas, apenas a *Syzygium cumini* (L.) Skeels, com presença característica de flavonoides e taninos, apresentou potencial antibacteriano contra *S. aureus* multirresistente (Inibição por difusão em disco < 7,0 mm) (NASCIMENTO et al., 2000). Um alcaloide isolado de *Nuphar japonicum* DC, identificado como 6,6'-dihidroxitobinufaridina, apresentou MIC entre 1 a 4 µg/mL contra várias cepas de MRSA e VRA podendo ser um candidato potencial para o desenvolvimento de um novo agente antibacteriano (OKAMURA et al., 2015). Triagem com 168 extratos a partir de 104 espécies vegetais demonstrou que plantas etnofarmacologicamente aplicadas para infecções cutâneas e em tecidos moles, tais como *Lonicera alpigena* L., *Castanea sativa* Mill., *Juglans regia* L., *Ballota nigra* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Leopoldia comosa* (L.) Parl., *Malva sylvestris* L., *Cyclamen hederifolium* Aiton, *Rosa canina* L., and *Rubus ulmifolius* Schott, apresentam bom potencial de inibição de biofilmes formados por MRSA (IC₅₀ < 32 µg/mL) (QUAVE et al., 2008). Triagem com extratos aquosos de 30 plantas indianas avaliou o potencial contra *S. aureus* e *E. faecalis* e demonstrou o potencial antibióticos (halo de difusão 12 a 26 mm e MIC 0,39 a 36,0 µg/mL) de diversas plantas usadas tradicionalmente para essa indicação (SAHU et al, 2015). Extratos de 19 plantas chinesas demonstraram boa atividade bacteriana contra MRSA (MIC = 1,25 - 3,07 µg/mL) (ZUO et al., 2008). Extrato de *Piper betle* L. demonstrou potencial contra cepas de *S. aureus* multirresistentes (MIC = 312,0 - 625,0 µg/mL) (VALLE et al., 2015), assim como flavonoides isolados de *Desmodium caudatum* (Thunb.) DC. contra MRSA (MIC = 31,3 - 250 µg/mL) (SASAKI et al., 20012). O efeito proteômico e antibacteriano sinérgico de epicatequina galato foi demonstrado em cepas de *K. pneumoniae* resistentes à imipenem e o cálculo da concentração inibitória fracional apresentou valores inferiores a 0,5 (CHO et al., 2011).

Embora o uso de produtos naturais seja ancestral e haja diversas pesquisas sobre sua ação antibiótica, estudos clínicos randomizados e controlados ainda são escassos, seja com cepas suscetíveis ou resistentes (MARTIN; ERNST, 2003). Apenas dois estudos clínicos de formulações tópicas a partir de óleo de *Melaleuca alternifolia* (Maiden & Betche) Cheel e extrato de *Atuna racemosa* Raf. foram encontrados e reportam a eficácia e segurança no tratamento contra MRSA (BUENZ et al., 2007; CAELLI et al., 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o controle de qualidade farmacognóstico a fim de estabelecer parâmetros mínimos de qualidade para os rizomas de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, bem como desenvolver e validar método quantitativo de controle de qualidade de extrato vegetal por cromatografia líquida de alta eficiência. Avaliar as características de extratos produzidos por planejamento estatísticos de misturas (centroide simplex), assim como seu potencial antibacteriano em cepas drogas-resistentes. Isolar substâncias polifenólicas presentes em frações semipurificadas por técnicas cromatográficas e identificar seus componentes por espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar o controle de qualidade farmacognóstico, incluindo as análises granulométrica, perda por dessecação, cinzas totais, resíduo seco, teor de polifenóis, perfil cromatográfico e potencial antioxidante de amostras de rizomas de *L. brasiliense*.

Desenvolver e validar método quantitativo de controle de qualidade para a fração acetato de etila do extrato bruto acetona:água (7:3, v/v) em CLAE com detector de arranjo de diodos (DAD).

Preparar extratos por planejamento estatístico de misturas com quatro componentes/solventes (água, metanol, acetona e etanol) e avaliar o ajuste dos modelos estatísticos sobre os parâmetros de resíduo seco, teor de polifenóis totais, teor de galocatequina e epigalocatequina. Assim como, avaliar a PCA e HCA dos perfis cromatográficos e espectros de UV.

Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos provenientes do planejamento estatístico de misturas contra *Enterococcus faecium* resistente a Vancomicina (VRE_{fm}), *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC) por modelos *in vitro* de determinação da concentração mínima inibitória (MIC).

Isolar e elucidar estruturas dos constituintes dos extratos e frações semipurificadas por técnicas de separação cromatográficas e elucidação estrutural das substâncias por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (LC-DAD-MS).

Dessa forma a tese foi organizada em três capítulos em forma de artigos, a saber:

Capítulo 1: Avaliação farmacognóstica, desenvolvimento e validação de método por CLAE-DAD para teor de galocatequina e epigalocatequina em rizomas de *L. brasiliense*

Capítulo 2: Atividade antibacteriana de *L. brasiliense* contra bactérias multirresistentes usando planejamento estatístico de misturas

Capítulo 3: Estudo fitoquímico de rizomas de *L. brasiliense*

CAPITULO 1: Avaliação farmacognóstica, desenvolvimento e validação de método por CLAE-DAD para teor de galocatequina e epigalocatequina em rizomas de *L. brasiliense*

Este artigo consiste na descrição de parâmetros de controle de qualidade farmacognóstico, assim como o perfil cromatográfico por CCD and CLAE de substâncias fenólicas de amostras de rizoma de *L. brasiliense* coletadas em diferentes épocas. Também foi demonstrado os dados de desenvolvimento e validação do método analítico de doseamento de galocatequina e epigalocatequina por CLAE. O artigo foi aceito para publicação na Revista Brasileira de Farmacognosia (Anexo 1).

Chapter 1: Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a HPLC-DAD technique for gallocatechin and epigallocatechin in rhizomes from *Limonium brasiliense*

*This paper describe the parameters of pharmacognostic quality control, as well as the chromatographic fingerprint by TLC and HPLC of phenolic compounds from rhizomes of *L. brasiliense* of different samples. It is also showed the data about the development and validation of HPLC method of gallocatechin and epigallocatechin assay. The paper was accept to publication by Brazilian Journal of Pharmacognosy (Annex 1).*

Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a HPLC-DAD technique for gallo catechin and epigallocatechin in rhizomes from *Limonium brasiliense*

*Andressa Blainski,¹ Tânia M. Antonelli-Ushirobira,¹ Guilherme Godoy,² Eneer V. S. Leite-Mello,³ João C. P. Mello*¹*

¹*Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Brazil*

²*Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Brazil*

³*Departamento de Ciências Morfológicas, Universidade Estadual de Maringá, Brazil*

*Correspondence: João Carlos Palazzo de Mello - Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá-PR, Brazil; mello@uem.br; Tel. +55 44 3011 4816; Fax. +55 44 3011 5050

Abstract: *Limonium brasiliense* is a plant from the southern coast of Brazilian that is used for the treatment of premenstrual syndrome, menstrual disorders and genito-urinary infections. The aim of the present study was to determine the quality control parameters for rhizomes collected during different periods by pharmacopoeial and non-pharmacopoeial methods, and to develop and validate a HPLC-DAD method for quantitative control of marker substances. The measured parameters were: granulometric analysis ($d_{50} = 0.21$ to 0.48 mm), loss on drying (11.1 to 12.4%), total ash (4.9 to 5.7%), dry residue by extraction with acetone:water (7:3, v/v) (30.6 to 39.5%), total polyphenol content (8.5 to 15.8%), and chromatographic fingerprint by HPLC and TLC. Besides, the acetone:water (7:3, v/v) extraction solvent in combination with a turbo-extractor, yielded the crude extract with a significant increase in tannins ($F_{4,20} = 37.0$, $p < 0.001$). The antioxidant potential of the crude acetone:water (7:3, v/v) extract, as well as the ethyl acetate and water fractions obtained after the partition process was evaluated by DPPH and the results were, respectively: $IC_{50} = 6.87$, 5.91 , and 6.92 $\mu\text{g/mL}$. The validation parameters for the HPLC-DAD method showed adequate specificity, precision and accuracy. The gallo- and epigallocatechin contents were, respectively, 0.8 to 2.7% and 1.2 to 2.2%. These data contribute to analysis of the pharmacognostic quality control of the commonly used part from this species.

Keywords: Baicuru, *Limonium brasiliense*, pharmacognostic evaluation, quality control, HPLC-DAD.

Conflict of interest: All authors have nothing to declare.

Introduction

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) is a perennial herb that grows in Argentina, Uruguay and the southern coast of Brazil. It is popularly known as “baicuru” or “guaicuru” (Murray et al., 2004). Preparations of their dried underground parts have been used in the treatment of premenstrual syndrome, menstrual disorders and genito-urinary infections (Fenner et al., 2006). Because of its traditional use, a clinical study was conducted to test the association of a liquid extract from *L. brasiliense* and the analgesic paracetamol in 36 women with symptoms related to menstrual disorders including dysmenorrhea, leucorrhoea or amenorrhoea. The improvement was excellent in 83.3% and good in 13.9% of the women, only 2.8% of them considered a regular improvement for this treatment. The treatment time varied between 11 and 50 days (Jahns and Crescente, 1976). Studies also report that these extracts have biological activities such as bacteriostatic, anti-inflammatory and antioxidant effects, and a toxicological evaluation of the extract demonstrated a low toxicity (Antonelli-Ushirobira et al., 2015). The presence of hydrolysable and condensed tannins, leucoanthocyanins, flavonoids, β -sitosterol, saponins, and coumarin have been reported in *L. brasiliense* (Murray et al., 2004). A recent morpho-anatomical study resolved some doubts in the literature as to the nature of the part used for medicinal purposes and defined its structure as the rhizome (Antonelli-Ushirobira et al., 2015).

One of the main complications of phytomedicine studies is the complexity of the process to evaluate natural products, because their quality and compounds characterization is difficult and differences may be induced in the pharmacokinetic, pharmacodynamic, and safety profiles (Nisbet et al., 1997). In addition, the chemical constituents of medicinal plants may vary according to genetic factors, weather, soil quality and other external factors (Gobbo-Neto and Lopes, 2007). This way, without suitable quality control parameters for the production of medicinal plants in order to obtain herbal drugs, it is impossible to ensure the reproducibility between different batches, or to assay for the absence of contaminants. Therefore, chemical, physical and physicochemical methods, as well as modern analytical methods, should be used to help define the features of natural drugs, in order to recognize and understand their possible variations (Gobbo-Neto and Lopes, 2007; Schulz et al., 2004). Tannins seem to be a featured chemical class present in *L. brasiliense*, however they are often present as complexes with other structures and the analytical data depends on several factors such as sample preparation, storage and extraction technique (Mueller-Harvey, 2001; Schofield et al., 2001).

In order to guarantee the safety and effectiveness of the phytotherapies, analytical methods for content determination are an integral part of the quality control of the source material. The determination of quality control parameters for plant drugs and extracts with high tannin content is complicated due to the structural complexity of this class. Frequently the biological, biochemical and chemical procedures must be conducted in concert. Although high-performance liquid chromatography methods are usually conducted according to the most common laboratorial routine, its

reliability requires an efficient process of development and validation (Lopes et al., 2009; Mueller-Harvey, 2001).

The purpose of the present study was to evaluate pharmacopoeial and non-pharmacopoeial parameters, and to develop and validate a high-performance liquid chromatography method for the determination of gallic catechin and epigallocatechin from *L. brasiliense* rhizomes.

Materials and Methods

Plant material

Rhizomes of *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) were collected in Rio Grande, in the state of Rio Grande do Sul, Brazil (S 32° 09' 22"/W 52° 06' 01") in May 2006 (sample A), (S 32° 00' 00"/W 52° 09' 00") May 2010 (sample B), and (S 31° 59' 33"/W 52° 10' 43") February 2013 (sample C). Voucher specimens were deposited at the Herbarium of the State University of Maringá under numbers HUEM-12151, HUEM-21152, and HUEM-27725, respectively. The plant material was collected under a permit from IBAMA-SISBIO, No. 11995-2, July 5, 2007, and 11995-3, November 2, 2010, authentication code 46367613, under the responsibility of J. C. P. Mello. Access to the botanical material was authorized and licensed by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), registered under No. 010252/2015-0. The plant materials were cleaned with water to remove soil, dried in a circulating-air oven (37 ± 2 °C), and powdered in a hammer mill (Tigre ASN-5).

Extract preparation

The crude extract (CE) was prepared from the dried rhizomes (samples: A - 0.63 kg; B - 5.6 kg; C - 5.0 kg) using an acetone:water solution (7:3, v/v, 10% w/v) and an Ultra-Turrax (UTC115KT, Wilmington, NC, USA; 3000 rpm, 4 times x 5 min, $t < 40$ °C). Next, the extract was filtered, the organic phase was removed in a rotavapor (Büchi R-135) and the residue was lyophilized (Christ Alpha 1–4) to yield the CE (A - 43.3%; B - 28.3%; C - 27.6%). The CE was solubilized in water in the proportion of 10% (w/v) and partitioned with ethyl acetate (10 times with the volume of water). The ethyl acetate (FAE) and aqueous (FAQ) fractions were concentrated and lyophilized as previously described to yield, respectively, FAE (A - 9.2%; B - 11.6%; C - 10.4%) and FAQ (A - 83.0%; B - 82.4%; C - 72.4%).

HPLC Method

High-performance liquid chromatography (HPLC) was conducted on an Agilent Model 1290 Infinity instrument with an Agilent Zorbax C-18 (250 mm x 4.6 mm) 5 μ m column. The mobile phase was composed of water:concentrated phosphoric acid (100:0.2, v/v, Solvent A) and acetonitrile:concentrated phosphoric acid (100:0.2, v/v, Solvent B) and used in the following elution

gradient: 0 min 10% B; 15 min 15% B; 35 min 19% B; 36 min 80% B; 44 min 80% B; 45 min 10% B; 52 min 10% B. The oven temperature was controlled at 24 °C (0–18 min), 35 °C (18–45 min), and 24 °C (45–52 min). The flow rate was 0.4 mL/min, and the injection volume was 10 µL. The detection was by UV in 210 nm and DAD (200–400 nm) was employed for determination of peak purity. The FAE samples were prepared in methanol:water (1:1, v/v) at 200.0 µg/mL with the help of an ultrasonic bath for 10 min and filtered (Millipore Millex-HV 0.45 µm) prior to injection. Reference substances (gallic acid, gallic acid, gallic acid, catechin, epigallocatechin, epicatechin, and ellagic acid, Sigma) were prepared in methanol:water (1:1, v/v) and injected into the HPLC instrument to identify the possible substances present in FAE samples by the comparison of retention times (RT), absorbance spectrum and increase to peak area with the addition of reference solutions in sample solution (spiked sample), as well as the concentrations of these present substances in the FAE for external standard.

Validation of the HPLC Method

For validation of the analytical method, the guidelines established by the International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH, 2005) and by Brazilian regulation RE No. 899/2003 of the National Health Surveillance Agency (ANVISA, 2003) were employed. The FAE from sample C was used to test the validation parameters.

Linearity between the peak area and concentration was analyzed using three calibration curves obtained from reference solutions of gallic acid (GC) and epigallocatechin (EGC) at five different concentrations in the range of 3.4 to 5.1 µg/mL and 3.2 to 4.8 µg/mL, respectively.

Specificity was determined by peak purity (≥ 0.99) of GC and EGC peaks from the sample solution. The DAD detector was employed. In addition, the sample solution was stored under relevant stress conditions (acid/basic hydrolysis, heat, oxidation and light) to promote the partial degradation of the sample and to show by the peak purity if the analyzed chromatographic peak could be attributable to only one component. For each condition, ca. of 2 mg of FAE was weighed into a 10 mL volumetric flask. For acid stress, 1 mL of 2 M HCl was added, and after 4 hours at room temperature it was neutralized with 1 mL of 2 M NaOH. For basic stress, 1 mL of 0.1 M NaOH was added, and after 3 h at room temperature it was neutralized with 1 mL of 0.1 M HCl. For heat stress, the FAE was stored in an oven at 60 °C for 40 h. For oxidation stress, 1 mL of 30% H₂O₂ was added and stored for 40 h at room temperature. For light stress, two samples, one in amber flask and other in transparent flask, were for 14 h in photostability chambers (Weiss, model Pharma 500-L). After all above procedure, the samples were diluted with methanol:water (1:1; v/v) to the concentration of 200.0 µg/mL and submitted to HPLC conditions.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined from the calibration curves of the GC and EGC. The LOD was established by using the expression $3\sigma/S$ and LOQ by

expression $10 \sigma/S$, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve.

Precision was evaluated on two levels: repeatability (intra-day) and intermediate (inter-day). The test of repeatability was carried out using three samples of the FAE at 80% (ca. 1.60 mg), at 100% (ca. 2.00 mg) and 120% (ca. 2.20 mg) in a 10 mL volumetric flask. For intermediate precision, the same procedure was performed on at least two different days on another HPLC instrument of the same model. Repeatability and intermediate precision were expressed as the residual standard deviation (RSD%) of the concentrations of GC and EGC in the dried FAE. A RSD% over 10% was considered unacceptable for the complex matrix.

The accuracy of the method was established based on the GC and EGC recovery tests using the addition of standard. The sample solutions were prepared from 1.00 mg of FAE in a 10 mL volumetric flask (50% of the normal preparation). The accuracy was assessed at three different levels in three replicates. A defined volume of reference solution equivalent at 12.72 μg of GC and 12.03 μg of EGC was added for the lower concentration (LC); at 21.22 μg of GC and 20.08 μg of EGC for the intermediate concentration (IC), and at 29.66 μg of GC and 28.06 μg of EGC for the higher concentration (HC). The known concentration was determined (based on assay of FAE by precision parameter) and the measured value was compared with the theoretical value. The accuracy was assessed as the recovery percentage and the method was considered accurate if the recovery percentages were between 85 and 115%.

Robustness was determined by comparing sample solutions that were analyzed under the established conditions and by changing the following parameters: from oven temperature gradient to a constant temperature at 24 °C and 35 °C, and eluent flow from 0.4 mL/min to 0.6 mL/min. In addition, the stability of the sample solution was assessed after 30 h at room temperature and in the injector at 10 °C.

Pharmacognostic quality control assays

The granulometry of the powder was measured by sieves of mesh sizes 150, 180, 212, 300, 600, and 850 μm (Bertel AGT-01) according to the method described by Brazilian Pharmacopeia (2010) and the median diameter (d_{50}) could be determined by the point of intersection of the curve of the percentage of residue fraction and percentage of passage fraction. The levels of total ash and loss on drying were determined according to methods described by the Brazilian Pharmacopeia (2010). The total polyphenol (TP) content was determined for milled rhizomes according to the method described by Glasl (1983). The milled rhizomes (20.0 g) from samples A, B, and C were extracted with acetone:water (7:3, v/v) by turbo-extraction (Ultra-Turrax® UTC IKA-125, 4 x 5 min, $t < 40$ °C) in the proportion of 10% (w/v). The extraction solutions were filtered and transferred to a volumetric flask and diluted to 200 mL. Portions of these solutions were used in the dry residue test according to the German Pharmacopeia (2015). The TP content expressed in pyrogallol was analyzed in the CE

(from samples A, B, and C) by spectrophotometry according to the method described by Blainski et al. (2013). The FAE (from samples A, B, and C) were analyzed by HPLC method to compare their chromatographic fingerprints and determine the GC and EGC contents. For thin-layer chromatography (TLC), the CE, FAE (samples A, B and C) and reference substances (gallic acid and gallo catechin – GA and GC, respectively) were prepared in methanol in the concentration of 40 mg/mL, 10 mg/mL and 1 mg/mL, respectively; sample solutions were 5 min in ultrasonic bath and followed to centrifugation (3 min, 13,400 rpm, Eppendorf MiniSpin); 40 μ L of each samples and 10 μ L of reference substances were applied in glass plate (TLC Silica gel 60 F254, 20 x 20 cm, Merck) by automatic Sampler (Camag); the elution was with ethyl acetate:formic acid anhydrous:water (90:5:5, v/v) for 15 cm; after drying, the TLC was sprayed with ferric chloride, hexahydrate, 1% in methanol (w/v) and the image was captured by in TLC Visualizer (Camag, system Vision Cats).

Comparison of extracted liquid and selective for tannins

Sample A extracts were prepared according to the previously described in extraction preparation with a series of different solutions: hydroethanol 50°GL (Extract A); hydroethanol 70°GL (Extract B); hydroethanol 90°GL (Extract C) and methanol: water (1:1, v/v) (Extract D), as well as acetone: water (7:3, v/v) (Extract E). The extracted solutions were used to determine dry residue (German Pharmacopeia, 2015), and CEs were obtained from remaining solutions and used to determine the TP and total tannin (TT) contents (Glasl, 1983). These results were used to compare different extraction solutions and to determine which is more selective for tannins in the context of the turbo-extraction process.

Antioxidant potential

Sample B was used to determine the free-radical scavenging capacity of the CE, FAE, and FAQ according to the method described by Amarowicz et al. (2004).

Statistical analysis

Data were analyzed by the Statistica® 8.0 program (Copyright StatSoft, Inc. 1984-2007) by a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test considering $p < 0.05$ as the significance level, as well as the t-test for two groups considering $p < 0.05$ as the significance level. Results were expressed as mean \pm standard deviation [residual standard deviation (RSD%)]. To determine the linearity of the method, line correlation tests and residual analysis were made by simple line regression considering R^2 values equal or greater than 0.99 and the residual sum of squares was evaluated.

Results and Discussion

HPLC Method Development

The extraction of the target phenolic compounds was performed by liquid-liquid extraction with ethyl acetate. The purification by solid-phase extraction (SPE C8 - 55 μm , 70 \AA) was tested and the results demonstrated no difference in the chromatographic profile, for this reason, the solid-phase extraction was not employed for preparation of samples. The choice of the detection wavelength is a crucial step in developing an efficient method. The spectra for all the main peaks were investigated by use of the DAD detector; the main peaks of chromatogram profile had a great absorbance at 210 nm (data not shown). In addition, the detection wavelength of 210 nm obtained a sufficiently large number of detectable peaks in the chromatograms. The choice of the C-18 column was based on previous data from the study of phenols (Lopes et al., 2009; Rosenthal et al., 2014; Soares et al., 2004), and there is a preference for a stable column in the acidic pH (1–6) range, considering the acidic mobile phase. For the composition of the mobile phase, acidification with 0.05% (pH = 2.21) and 0.1% (pH = 1.93) trifluoroacetic acid, 0.2% formic acid (pH = 2.47) and 0.2% (pH = 1.94) and 0.4% (pH = 1.78) phosphoric acid were tested. Acidification with 0.2% phosphoric acid demonstrated a suitable separation of compounds. The spectra for all signals were recorded in the range of 200–400 nm; this allowed for the determination of the suitable purity peak for all eight major peaks (> 0.99) and suggest the identification of three substances by spectral similarity, RT and spiked sample with the reference substance: GA (RT = 9.9 min), GC (RT = 13.1 min), and EGC (RT = 17.8 min). The GC and EGC were chosen for the validation procedures. The others major peaks (RT = 18.4; 22.9; 25.8; 29.4, and 32.0 min) showed characteristic spectra for condensed tannins with a absorption band at round 275 nm and a shoulder at 305 nm, commonly attributed, respectively, to the A-ring and B-ring from the flavan-3-ols and flavan-3,4-diols units (Vihakas, 2014). Figure 1 shows the obtained the spectra and chromatographic profiles. The HPLC method carried out in this study was aimed at developing a chromatographic system capable of eluting and resolving phenolic compounds in plant materials. The preliminary investigations were directed toward evaluating the effect of various factors on the system. The factors assessed include sample purification, detection wavelength, the column type, and the composition of the mobile phase. The elimination of high molecular weight phenolic compounds from the plant extract is critically important, because of the interaction of these compounds with the stationary phase. This interaction can seriously damage the analytical column, interfering with the chromatographic process (Lopes et al., 2010).

Validation of the HPLC Method

The calibration equation in the linearity test was $y = 1.44 \cdot 10^8 x + 1.2 \cdot 10^7$ ($n = 3$, $r^2 = 0.9980$) for GC and $y = 1.41 \cdot 10^8 x + 1.0 \cdot 10^7$ ($n = 3$, $r^2 = 0.9950$) for EGC. The RSD% of the slopes was 2.3 and 1.8% for GC and EGC, respectively. Table 1 shows the statistical data for the regression equations

with analysis of variance and lack of fit calculations for calibration curves of GC and EGC. The calibration curves are adequate for assay determination and statistical data comply with all requirements for linear regression: calculated F-value is lower than critical F-value, as well as the lack of fit error than sum of pure error, and the ANOVA test is significant.

The specificity of the method was shown by comparing the UV spectra of GC (13.1 min) and EGC (17.8 min) in the reference solution with those from the test solution. The purity of the GC, EGC, and six other main peaks was suitable (> 0.99). The degradation of both peaks was suitable for the acid, heat and oxidation and light stress conditions, because they provided the partial degradation, by which was allowed the reliable analyses of the peak purity of the remaining GC and EGC (Table 2). On the other hand, the sample appeared to be very sensitive to the basic condition and there was almost complete degradation of the GC and EGC peaks even under more mild conditions. However, it seems that substances resulting from the degradation induced by basic stress do not interfere with the retention times for GC and EGC. Thus, the chromatography method is considered specific for assay of GC and EGC.

The LOD is defined as the lowest absolute concentration of analyte in solution that can be detected but not necessarily quantified under the stated experimental conditions and was $0.161 \mu\text{g/mL}$ for GC and $0.238 \mu\text{g/mL}$ for EGC. The LOQ is defined as the lowest concentration of analyte in solution that can be quantitatively determined with acceptable precision and accuracy. It was $0.536 \mu\text{g/mL}$ for GC and $0.793 \mu\text{g/mL}$ for EGC.

The repeatability and the intermediate precision for sample were $2.7\% \pm 0.086$ [3.2%] and $2.8\% \pm 0.042$ [1.5%] for GC, and $2.2\% \pm 0.126$ [5.8%] and $2.3\% \pm 0.085$ [3.7%] for EGC, respectively. By t-test, there was no significant difference ($t_{1,16} = -1.85$, $p = 0.08$) for EGC between the results of repeatability and intermediate precision analyses. On the other hand, there was a significant difference ($t_{1,16} = -2.80$, $p < 0.05$) for GC, but the low RSD% (2.9%) for the mean from all samples of GC ($2.8\% \pm 0.080$ [2.9%]) showed suitable data for the complex matrix, so it is considered, that the method is precise for both substances.

The accuracy of the method was established based on the recovery test for GC and EGC. The mean recovery rate was $102.3\% \pm 1.54$ [1.5%] for GC and $99.7\% \pm 1.93$ [1.9%] for EGC (Table 3). The result is according to the accepted criterion, thus the method has excellent accuracy for herbal drugs.

To ensure that the HPLC method is insensitive to minor changes in experimental conditions, it tests the robustness parameters. When the oven temperature was changed from a gradient to a constant temperature of $24 \text{ }^\circ\text{C}$, the resolution retention time (RT) and peak area of the GC and EGC had no significant change. However, the chromatographic profile after 25 min and resolution of these peaks was changed. At a constant temperature of $35 \text{ }^\circ\text{C}$, there were alterations in the RT of GC and EGC, and the resolution between EGC and peak at 18.4 min was lost completely. When the eluent flow was

changed to 0.6 mL/min, this changed the RT of the main peaks, including for GC and EGC. The resolution for some peaks was also lost, but there was no significant change in peak area for GC and EGC. Regarding the stability of the sample solution, no difference was observed for the samples left in the injector at 10 °C for 30 h. However, there was a significant content decrease of GC (ca. 12%) at room temperature. These results demonstrated, that it should procedure the method under determinate conditions and some change can induce to problems with chromatographic profile and resolution.

Pharmacognostic quality control assays

The results of pharmacognostic quality control assays from milled rhizomes (granulometry, total ash, loss on drying and total polyphenols), CE (dry residue and TP), and FAE (GC and EGC) in samples A, B, and C are presented in Table 4.

Sample B has a TP rhizome lower than that of the other samples, but this seems to have no substantial differences among the samples in relation to the dry residue and TP in the CE. The d_{50} determined from the curves shows a value substantially lower for sample B (0.21 mm) in relation to the other samples (0.42 mm and 0.48 mm). However, this lower diameter did not seem to influence the extraction yield, presumably because it is a turbo-extraction process, where happens the breaking of particles. The granulometric distribution is an important factor in obtaining plant extracts, mainly because the extraction yield is closely related to the surface area and particle size in contact with the extraction liquid. Studies to determine the existence of positive and negative influences from the d_{50} on extraction yield are possible through factor analysis (Delaporte et al., 2001; Mello and Petrovick, 2000).

The total ash results range between 4.9% and 5.7% from the three different samples show good consistency for the total ash determination for this species. Total ash is a measure of the quantity of non-volatile inorganic impurities, because it is influenced by contamination or adulteration of plant products (Mukherjee, 2002). The total ash includes those derived from plant tissue (physiological ash) and foreign material, specifically sand and dirt adhering on the surface of the plant (non-physiological ash). The percentage of total ash may vary with the plant species and must be determined individually for each species. For plant drugs, the percentage of total ash is between 3 and 15% for some species described in the Brazilian Pharmacopoeia (2010).

The results of loss on drying lesser than 14% show that the drying process was efficient. For some species described in the Brazilian Pharmacopoeia (2010), the percentage of loss on drying is between 8 and 14%. The percentage of loss on drying is a parameter that can be used to estimate the efficiency of the plant drying procedure. The excess water in plant drugs promote the growth of fungi, bacteria or insects and promote hydrolysis of its constituents. For this reason, limits of water content are described for herbs, especially for those that readily absorb water or those for which degradation is

promoted by the presence of water. This parameter is critical to determine the stability of the drug during the storage period (Mukherjee, 2002).

Although the TP contents were not so different among the samples (25.0 to 33.1%), the GC and EGC contents showed results in a large interval: 0.8 to 2.7% and 1.2 to 2.2%, respectively. It was possible to note difference of GA peak area. Thereupon, we can say that the concentrations of GA was approximately 0.5, 2.4, and 1.6% for sample A, B, and C, respectively. These values were calculated from known concentration GA solutions, although there was no validation test for this analyte, but it also showed a large interval among the samples. To ensure the acceptable interval for compound assay, it recommends the evaluation of a wide number of samples from different year seasons and regions.

Figure 1 shows the HPLC fingerprints of FAE from samples A, B, and C. There is a good similarity between the samples regarding their peak retention time; however, the peaks have different proportions. The Figure 2 shows the TLC fingerprints of CE and FAE from samples A, B, and C. As well as HPLC fingerprint, it is possible to note a good similarity with difference intensity among the spots. For example, in the sample B, the spot of GA is stronger, but weak spot of GC is fast absent, that it complies with HPLC fingerprint. For complex botanicals, quantitation of a single compound usually does not provide complete information. For this reason, chromatographic fingerprint technology is accepted by the WHO (1991) as a strategy for identification and evaluation of the quality of herbal medicines. This work shows for the first time the chromatographic fingerprints for *L. brasiliense*, and the results seem to provide a reliable and sensitive quality assessment method with characteristic retention time, as well UV spectra of peaks for HPLC method. The HPLC fingerprint analysis can be used for qualitative analysis, especially to identify and standardize plant materials and preparations. This analysis requires good separation and resolution of the complex mixture as well as peak purity control in order to prevent overlapping of the peaks (Ding et al., 2011; Rehwald et al., 1994). HPLC fingerprinting has become an attractive option for the quality control of complex plant mixtures because of its focus on identification, ensuring no adulterants (He et al., 2005), and assessing the stability of the plants, seeing that changes in the HPLC fingerprint can occur in samples by the influence of external factors such as temperature, humidity, and stress conditions (Heigl and Franz, 2003). Several studies have shown that the HPLC fingerprint can be used to characterize plant drugs that have polyphenols as primary components (Chou et al., 2009; Lopes et al., 2009; Lopes et al., 2010; Marques et al., 2007; Simirgiotis and Schmeda-Hirschmann, 2010). The TLC is a classic method for quality control of natural products and it is required for all pharmacopoeia. It is of simple performance and low cost, what makes possible easily its use. As well HPLC fingerprint, TLC was also adequate to determine a characteristic fingerprint for this herbal drug. Differences among samples A, B and C can be observed, suggesting that it is important hereafter to correlate the fingerprints with the seasonal conditions and possible differences in pharmacological activities.

Comparison of extraction liquid and selectivity for tannins

The preparation of different extracts followed by analysis of the dry residue, TP and TT are shown in Table 5. According to the data, there is a significant increase in dry residue from Extract E [extraction liquid acetone: water (7:3, v/v)] compared with the other extracts ($F_{4,20} = 136.0$, $p < 0.001$). In addition, Extract E shows significantly higher levels of TP ($F_{4,20} = 23.7$, $p < 0.001$) and TT ($F_{4,20} = 37.0$, $p < 0.001$), and comparatively higher TT/TP ratio ($F_{4,20} = 86.0$, $p < 0.001$).

The preparation of different extracts followed by analysis of dry residue and chemical compound content may provide complementary data for quality control and contribute to the choice of the best extraction solvent. According to our data (Table 5), it was determined that the best extraction solvent for the preparation of crude extract of dry rhizomes of the *L. brasiliense* by tubo-extraction process is acetone:water (7:3, v/v). According to Mueller-Harvey (2001), 50-70% aqueous acetone is often the better solvent more than water or methanol to extract hydrolysable tannins. However, methanol or water can extract better tannins of low molecular weight.

Considering the high quantity of tannins among the polyphenols of dry rhizomes from *L. brasiliense* and comparing with other plants, it is possible to affirm that it is a representative species for tannins. Commission E (1994) determined tannin content of 3% for *Crataegus oxyacantha* L. and 10% for *Krameria triandra* Ruiz & Pav.; both are classical plant drugs for tannins. *Stryphnodendron obovatum* Benth. and *S. polyphyllum* Mart. have tannin contents of 19 and 12%, respectively (Lopes et al., 2005), and *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville has a minimum of 8% of total tannins (Brazilian Pharmacopeia, 2010).

Antioxidant potential

The results for the CE, FAE, and FAQ from sample B were, respectively, 6.87, 5.91, and 6.92 $\mu\text{g/mL}$. Trolox and Vitamin C were used as controls, and their results were 3.97 and 4.36 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The antioxidant effect of polyphenols is known, however a recent study suggested that *Rosa canina* L. fruit extract, which is rich in polyphenols, may act not only as an antioxidant, but also as a prooxidant in high concentrations, showing that it is necessary to define an optimal concentration of polyphenols for antioxidant activity (Kiliçgün and Altiner, 2010). Although it could be already expected a good antioxidant potential for *L. brasiliense*, since the sample showed a high TP and tannic substances, few studies have related this activity to plants of the genus *Limonium*, and this investigation proposed to show these potential even with the sample with lower phenolic contents.

Aniya et al. (2002) showed a strong antiradical activity ($\text{IC}_{50} = 7.5 \mu\text{g/mL}$) by the DPPH method for aqueous extracts from *L. wrightii* (Hance) Kuntze. Murray et al. (2004) showed an IC_{50} of 20 $\mu\text{g/mL}$ for a methanolic extract from *L. brasiliense* by the DPPH assay. The present results exhibited major antioxidant potential for the acetone:water (7:3, v/v) extract and its ethyl acetate fraction, in comparison with the above result.

Conclusions

In the absence of updated pharmacopoeia data regarding *L. brasiliense*, these results can be used as quality control parameters and contribute to the pharmacognostic quality of such extracts. The TLC and HPLC fingerprint have been shown to be a valuable tool for the chemical analysis of complex matrices. The validation of a HPLC method offers chromatographic conditions for determination and analysis of GC and EGC. The method was found to be specific and suitable for routine analysis. It is also simple, sensitive, accurate, and reproducible.

Acknowledgments

The authors thank A. Arantes for technical support during the experiments, Aché Laboratórios Farmacêuticos SA for providing the UV and HPLC instrumentation and Finzelberg GmbH &Co. KG for TLC instrumentation for analytical experiments. This study received support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the Higher Education Staff Development Coordination (CAPES), FINEP, Araucária Foundation, and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if).

Authors' contributions

AB (Ph.D. student) collected and dried the plant material samples A and C, prepared their voucher specimens, worked on laboratorial tests with both samples, conducted all HPLC and TLC analysis, and wrote and formatted the article. TMAU (Ph.D.) collected and dried sample B of the plant material, prepared its voucher specimen, worked in laboratorial tests with this sample, and assisted with writing. GG (undergraduate student) assisted in laboratory work with sample B. EVSLM assisted in the project design and reviewed the manuscript. JCPM was responsible for the project concept and supervision of the study, as well as the writing and review of the manuscript.

References

- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J.A., 2004. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the *Canadian prairies*. *Food Chem.* 84, 551–562.
- Aniya, Y., Miyagi, C., Nakandakari, A., Kamiya, S., Imaizumi, N., Ichiba, T., 2002. Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. *Phytomedicine.* 9, 239–244.
- Antonelli-Ushirobira, T., Blainski, A., Gancedo, N.C., Gaburo, F., Cardoso, K.A.K.C., Leite-Mello, E.V.S., Mello, J.C.P., Milaneze-Gutierrez, M.A., 2015. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 25, 320–327.
- Antonelli-Ushirobira, T., Blainski, A., Fernandes, H.G., Moura-Costa, G.F., Costa, M.A., Campos-Shimada, L.C., Salgueiro-Pagadigorria, C.L., Kaneshima, E.N., Becker, T.C.A., Leite-Mello, E.V.S., Mello, J.C.P., 2015. Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 174, 293-298.

- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003. Resolução RE nº 899 - Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília:ANVISA.
- Blainski, A., Lopes, G.C., Mello, J.C.P. 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules*. 18, 6852–6865.
- Brazilian Pharmacopeia, 2010. *Farmacopeia Brasileira*. 5th ed. Brasília:ANVISA.
- Chou, G., Xu, S.J., Liu, D., Koh, G.Y., Zhang, J., Liu, Z., 2009. Quantitative and fingerprint analyses of chinese sweet tea plant (*Rubus suavissimus* S. Lee). *J. Agr. Food Chem*. 57, 1076–1083.
- Commission E - *Kommission E*, 1994. Liste der Monographien. Bundesanzeiger. Bundesgesundheitsamt-Institut für Arzneimittel.
- Delaporte, R.H., Sánchez, G.M., Cuellar, A.C., Mello, J.C.P., 2001. Control de calidad y actividad antiinflamatoria de las drogas vegetales *Altemantbera brasiliiana* (L.) Kuntze y *Bouchea flumtnensis* (Vell.) Mold. *Acta Farm. Bonaer*. 20, 39–46.
- Ding, Y., Wu, E.Q., Liang, C., Chen, J., Tran, M.N., Hong, C.H., Jang, Y., Park, K.L., Bae, K., Kim, Y.h., Kang, J.S., 2011. Discrimination of cinnamon bark and cinnamon twig samples sourced from various countries using HPLC-based fingerprint analysis. *Food Chem*. 127, 755–760.
- Fenner, R., Betti, A.H., Mentz, L.A., Rates, S.M.K., 2006. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Rev. Bras. Cienc. Farm*. 42, 269–394.
- German Pharmacopeia, 2015. *Deutsches Arzneibuch*. Bonn:Deutscher Apotheker Verlag.
- Glasl, H., 1983. Zur Photometrie in der Drogenstandardisierung - 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. *Deutsche Apotheker Zeitung*. 123, 1979–1983.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N.P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*. 30, 374–381.
- He, Z.D., Qiao, C.F., Han, Q.B., Cheng, C.L., Xu, H.X., Jiang, R.W., But, P.P., Shaw, P.C., 2005. Authentication and quantitative analysis on the chemical profile of cassia bark (*Cortex Cinnamomi*) by high-pressure liquid chromatography. *J. Agr. Food Chem*. 53, 2424–2428.
- Heigl, D., Franz, G., 2003. Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. *Pharmazie*. 58, 881–885.
- ICH, 2005. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Topic Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Methodology.
- Janhs, R.T., Crescente, A.S., 1976. Ensaios farmacológicos e clínicos com a associação do extrato fluido de *Limonium brasiliense* e N-acetil-p-aminophenol. *Trib. Pharm*. 44, 105–111.
- Kiliçgün, H., Altiner, D., 2010. Correlation between antioxidant effect mechanisms and polyphenol content of *Rosa canina*. *Pharmacogn. Mag*. 6, 238–241.
- Lopes, G.C., Brainski, A., Santos, P.V.P., Diciaula, M.C., Mello, J.C.P., 2010. Development and validation of an HPLC method for the determination of epicatechin in *Maytenus ilicifolia* (Schrad.) Planch., Celastraceae. *Rev. Bras. Farmacogn*. 20, 789–795.
- Lopes, G.C., Bruschi, M.L., Mello, J.C.P., 2009. RP-LC-UV Determination of proanthocyanidins in *Guazuma ulmifolia*. *Chromatographia*. 69, 175–181.
- Lopes, G.C., Sanches, A.C.C., Nakamura, C.V., Dias-Filho, B.P., Hernandez, L., Mello, J.C.P., 2005. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrisation of cutaneous wounds in rats. *J. Ethnopharmacol*. 99, 265–272.
- Marques, L.C., Pieri, C., Roman-Junior, W., Cardoso, M.L.C., Milaneze-Gutierrez, M.A., Mello, J.C.P., 2007. Controle farmacognóstico das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Malpighiaceae). *Rev. Bras.Farmacogn*. 17, 607–615.

- Mello, J.C.P., Petrovick, P.R., 2000. Quality control of *Baccharis trimera* (Less.) DC (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. *Acta Farm. Bonaer.* 19, 211–216.
- Mueller-Harvey, I., 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Tech.* 91, 3–20.
- Mukherjee, P.K., 2002. Quality Control Herbal Drugs: an approach to evaluation of botanicals. New Delhi:Business Horizons, p. 183-245.
- Murray, A.P., Rodriguez, S., Frontera, M.A., Tomas, M.A., Mulet, M.C., 2004. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z. Naturforsch.* 59c, 477–480.
- Nisbet, L.J., Moore, M., 1997. Will natural products remain an important source of drug research for the future? *Curr. Opin. Biotech.* 8, 708–712.
- Rehwald, A., Meier, B., Sticher, O., 1994. Qualitative and quantitative reversed-phase high-performance liquid chromatography of flavonoids in *Crataegus* leaves and flowers. *J. Chromatogr. A.* 677, 25–33.
- Rosenthal, I., Wolfram, E., Meier, B., 2014. An HPLC method to determine sennoside A and sennoside B in *Sennae fructus* and *Sennae folium*. *Pharmeur. Bio. Sci. Notes.* 2014, 92–102.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 91, 21–40.
- Schulz, V., Hänsel, R., Blumenthal, M., Tyler, V.E., 2004. Medicinal Plants, Phytomedicines, and Phytotherapy. In *Rational Phytotherapy: A reference guide for physicians and pharmacists*. Berlin Heidelberg:Springer-Verlag, p.1–42.
- Simirgiotis, M.J., Schmeda-Hirschmann, G., 2010. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 217, 443–449.
- Soares, L.A., Oliveira, A.L., Ortega, G.G., Petrovick, P.R., 2004. Development and validation of a LC-method for determination of catechin and epicatechin in aqueous extractives from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 787–790.
- Vihakas, M., 2014. Flavonoids and other phenolic compound: characterization and interaction with lepidopteran and sawfly larvae. Turku, 135 p. Doctor Thesis, University of Turku. (<http://www.doria.fi/handle/10024/100939>).
- WHO, 1991. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. Munich: WHO.

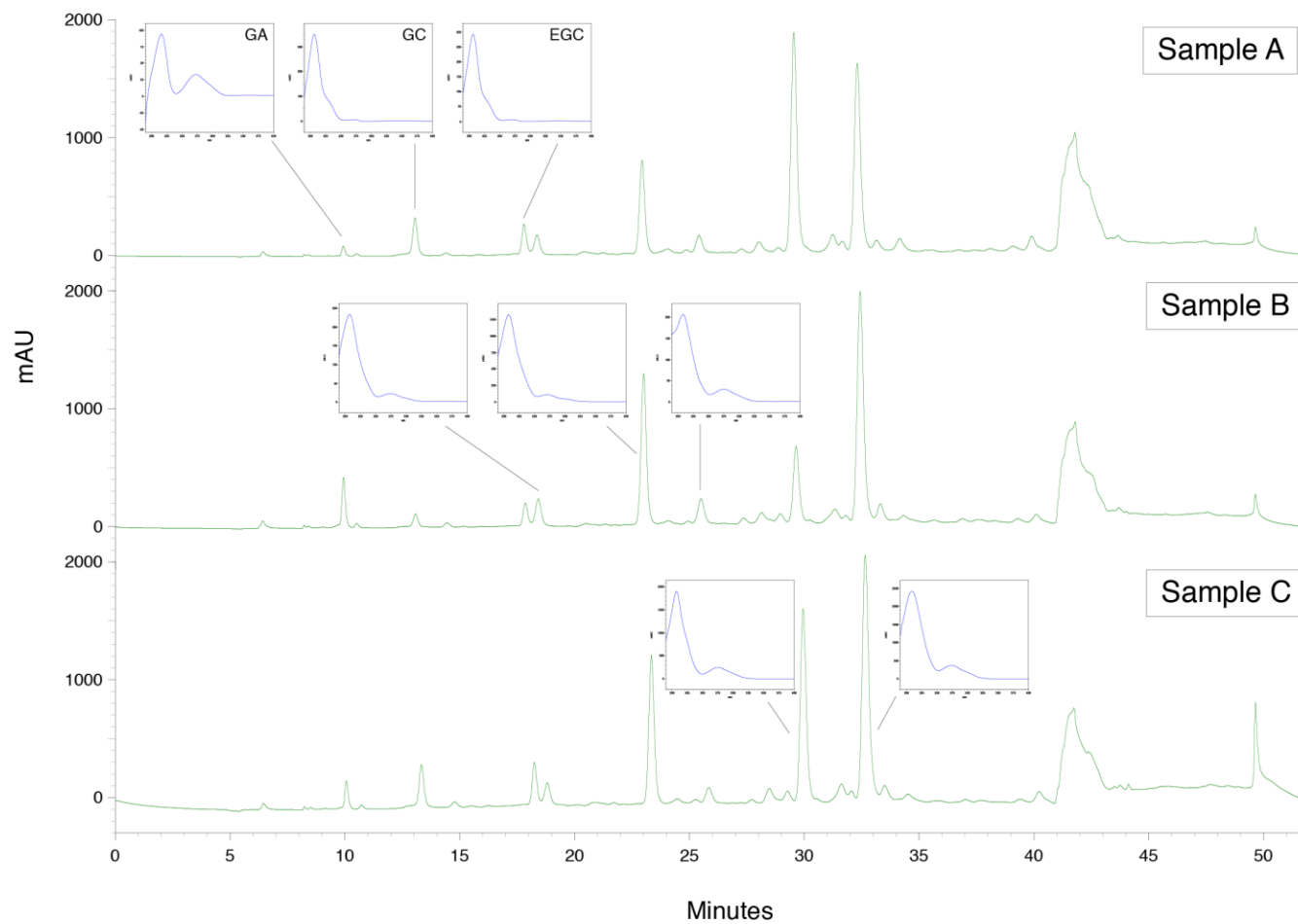


Figure 1. HPLC fingerprint of the ethyl acetate fraction (FAE) from *L. brasiliense* rhizomes extracted with acetone:water (7:3, v/v) for samples A, B, and C. GA = gallic acid; GC = gallo catechin; EGC = epigallocatechin

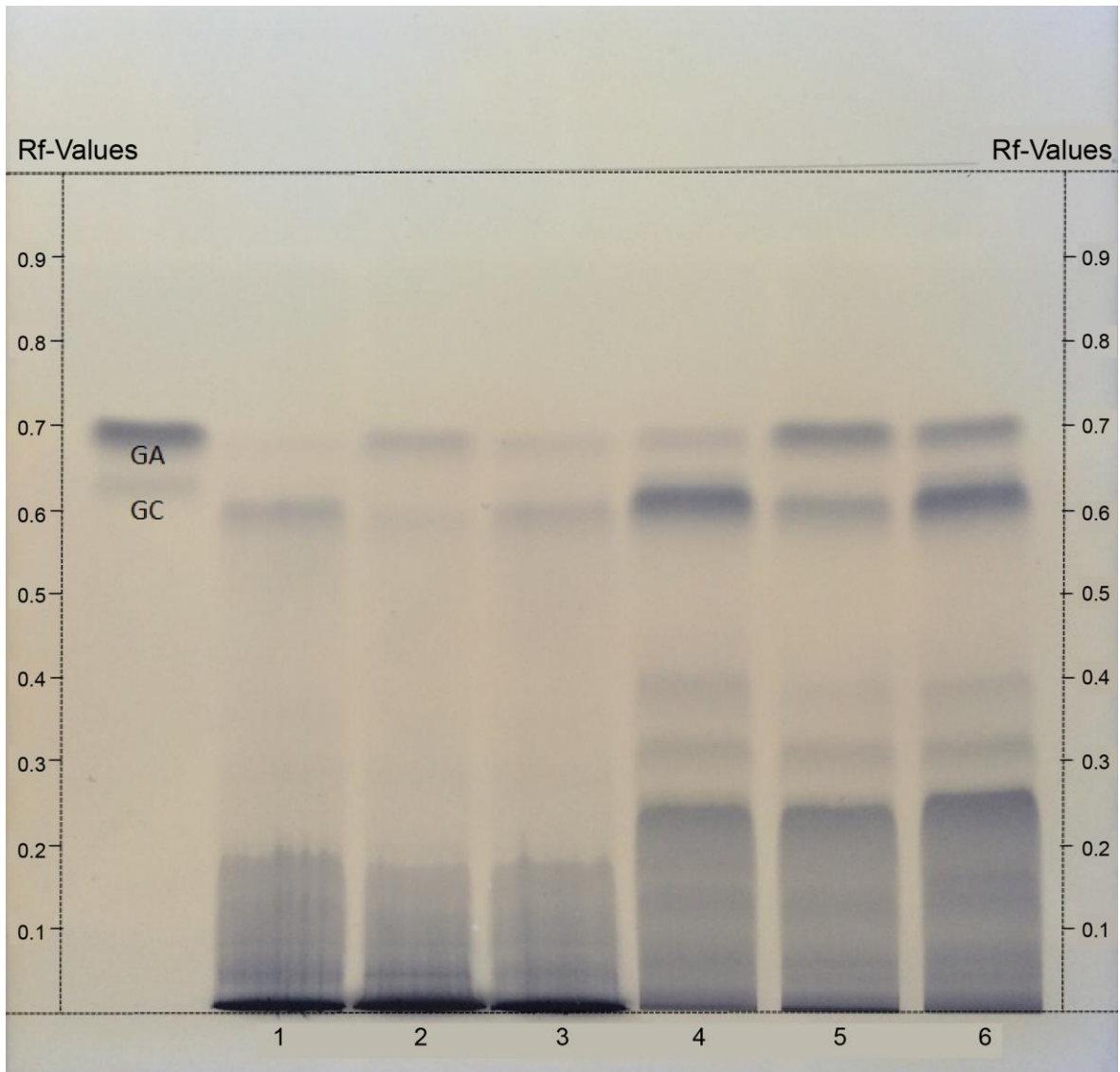


Figure 2. TLC fingerprint of the crude extract (CE) and ethyl acetate fractions (FAE) from *L. brasiliense* rhizomes extracted with acetone: water (7:3, v/v) for Samples A, B and C. GA = gallic acid; GC = gallo catechin; 1, 2 and 3 = CE from samples A, B and C, respectively; 4, 5 and 6 = FAE from samples A, B and C, respectively

Table 1. Statistical data for the regression equations of the calibration curves for gallicocatechin (GC) and epigallocatechin (EGC) by the HPLC method.

Regression analysis	Calibration curve for GC		Calibration curve for EGC	
Slope (SE)	1.44 x 10 ⁸ (2.29 x 10 ¹⁴)		1.41 x 10 ⁸ (4.78 x 10 ¹⁴)	
Intercept (SE)	1.2 x 10 ⁷ (7.74 x 10 ⁶)		1.0 x 10 ⁸ (1.1 x 10 ⁷)	
Regression coefficient (R ²)	0.9980		0.9950	
Calculated F-value (critical F-value)	0.30 (3.71)		0.30 (3.71)	
Sum of pure error	3.51 x 10 ¹⁶		5.09 x 10 ¹⁶	
Lack of fit error	3.48 x 10 ¹⁵		5.04 x 10 ¹⁵	
Analysis of variance	F _{1,13} = 6385.7 <i>p</i> < 0.001		F _{1,13} = 2610.8, <i>p</i> < 0.001	
95% CL Slope	1.40 x 10 ⁸ ; 1.48 x 10 ⁸		1.35 x 10 ⁸ ; 1.47 x 10 ⁸	
95% CL Intercept	-4.6 x 10 ⁶ ; 2.9 x 10 ⁷		7.7 x 10 ⁷ ; 1.2 x 10 ⁸	
	SS	MS	SS	MS
Regression	1.13 x 10 ¹⁷	1.13 x 10 ¹⁷	9.60 x 10 ¹⁶	9.60 x 10 ¹⁶
Residual	2.29 x 10 ¹⁴	1.76 x 10 ¹³	4.78 x 10 ¹⁴	3.68 x 10 ¹³
Total	1.13 x 10 ¹⁷		9.64 x 10 ¹⁶	

SE = standard error; SS = Sum of Squares; MS = Mean Square; CL = Confidence Limits

Table 2. The partial degradation and the reliability analyses of the purity peak for the remaining gallicocatechin (GC) and epigallocatechin (EGC) in stress conditions for specificity test.

Condition for degradation		GC content (%)/Purity Peak	EGC content (%)/Purity Peak
Normal Condition		2.8/1.0000	2.3/1.0000
Acid stress		2.3/1.0000	1.1/1.0000
Heat stress		2.3/1.0000	1.8/1.0000
Oxidation stress		2.9/1.0000	2.1/1.0000
Basic stress		0.1/0.8771	0.2/0.9153
Light stress	Amber	2.7/1.0000	2.1/1.0000
	Transparent	2.4/1.0000	1.9/1.0000

Table 3. Accuracy results determined by analyzing gallic catechin (GC) and epigallocatechin (EGC) in solutions of known concentration from *Limonium brasiliense*.

	Gallic catechin				Epigallocatechin			
	Theoretical concentration (µg/mL)	Measured concentration (µg/mL)	% Recovery	$\bar{x} \pm sd$ [RSD(%)]	Theoretical concentration (µg/mL)	Measured concentration (µg/mL)	%Recovered	$\bar{x} \pm sd$ [RSD(%)]
LC	3.8266	3.9419	103.0	103.5% ± 0.91 (0.9%)	3.2580	3.1848	97.8	97.8 ± 1.29 (1.3%)
	3.7543	3.9246	104.5		3.1998	3.1698	99.1	
	3.6338	3.7400	102.9		3.1029	2.9938	96.5	
IC	4.6284	4.7329	102.2	102.4% ± 0.88 (0.9%)	4.0242	4.0083	99.6	100.2 ± 0.87 (0.9%)
	4.7248	4.7996	101.6		4.1018	4.0888	99.7	
	4.7007	4.8576	103.3		4.0824	4.1293	101.2	
HC	5.5929	5.5731	99.6	100.9% ± 1.73 (1.7%)	4.9192	4.8997	99.6	101.2 ± 1.85 (1.8%)
	5.5929	5.7554	102.9		4.9192	5.0766	103.2	
	5.4731	5.4883	100.3		4.9599	4.9921	100.7	
Total			102.3% ± 1.54 (1.5%)				99.7 ± 1.93 (1.9%)	

\bar{x} = mean (%); sd = standard deviation; RSD = residual standard deviation

Table 4. Results of pharmacognostic quality control assays from *Limonium brasiliense* (samples A, B, and C).

	Sample A	Sample B	Sample C
Granulometry (d ₅₀) - MR	0.42 mm	0.21 mm	0.48 mm
Total ash - MR*	5.6% ± 0.15 [2.7%]	5.7% ± 0.07 [1.4%]	4.9% ± 0.05 [1.0%]
Loss on drying - MR*	11.1% ± 0.25 [2.3%]	12.4% ± 0.28 [2.4%]	11.9% ± 0.04 [0.4%]
PT - MR*	15.8% ± 0.12 [0.8%]	8.5% ± 0.36 [4.3%]	9.4% ± 0.11 [1.2%]
Dry residue - MR*	39.5% ± 0.63 [1.6%]	36.1% ± 0.61 [1.7%]	30.6% ± 0.19 [0.6%]
TP - CE*	28.9% ± 0.42 [1.5%]	25.0% ± 1.94 [0.8%]	29.1% ± 0.30 [1.1%]
GC - FAE*	2.6% ± 0.06 [2.3%]	0.8% ± 0.03 [3.7%]	2.7% ± 0.09 [3.2%]
EGC - FAE*	1.8% ± 0.03 [1.8%]	1.2% ± 0.02 [1.9%]	2.2% ± 0.13 [5.8%]

* $\bar{x} \pm sd$ [RSD(%)]: \bar{x} = mean; sd = standard deviation; RSD = residual standard deviation;

MR = milled rhizome; CE = crude extract; FAE = ethyl acetate fractions; TP = total polyphenols; GC = gallicocatechin; EGC = epigallocatechin

Table 5. Results for the comparison of the extraction liquid and selected tannins in sample A.

	Extract A	Extract B	Extract C	Extract D	Extract E
TP*	31.0% ± 0.32 [1.0%]	29.3% ± 0.34 [1.2%]	30.2% ± 1.12 [3.7%]	31.3% ± 0.46 [1.5%]	33.1% ± 0.64 [2.0%] ^a
TT*	27.6% ± 0.33 [1.2%]	25.3% ± 0.36 [1.4%]	25.9% ± 1.02 [4.0%]	27.7% ± 0.42 [1.5%]	29.5% ± 0.60 [2.0%] ^a
%TT/TP*	88.9% ± 0.27 [0.3%]	86.6% ± 0.34 [0.4%]	85.7% ± 0.50 [0.6%]	88.7% ± 0.21 [0.2%]	89.2% ± 0.49 [0.6%] ^a
Dry residue*	36.4% ± 0.41 [1.1%]	32.2% ± 0.34 [1.1%]	29.9% ± 0.16 [0.5%]	36.3% ± 0.56 [1.5%]	39.5% ± 0.63 [1.6%] ^a

* $\bar{x} \pm sd$ [RSD(%)]: \bar{x} = mean; sd = standard deviation; RSD = residual standard deviation;

TP = total polyphenols; TT = total tannins

^a $p < 0.001$

CAPITULO 2: Atividade antibacteriana de *L. brasiliense* contra bactérias multirresistentes usando planejamento estatístico de misturas

Este artigo consiste no planejamento estatístico de misturas quaternárias (centróide simplex) a partir dos rizomas de *L. brasiliense* considerando os parâmetros de resíduo seco, teor de polifenóis, galocatequina e epigalocatequina, assim como a análise de componente principal e análise de agrupamento hierárquica dos cromatogramas e dos espectros de UV. Além disso, foi testado o potencial antibacteriano das amostras contra VRE_{fm}, MRSA e KPC. O artigo será submetido à publicação em revista científica da área farmacêutica.

Chapter 2: Antibacterial activity of Limonium brasiliense (Baicuru) against multidrug-resistant bacteria using a statistical mixture design

*This paper describe the statistical mixture design with four solvents (simplex centroid) from rhizome of *L. brasiliense* considering the parameters of dry residue, total poliphenols, galocatechin and epigallocatechin contents, as well as the principal component analysis (PCA) and the hierarchical clusters analysis (HCA) of chromatograms and UV spectra. Besides, it was tested the antibacterial potential against the VRE_{fm}, MRSA and KPC. The paper will be submitted to publication by scientific journal of pharmaceutical area.*

Antibacterial activity of *Limonium brasiliense* (Baicuru) against multidrug-resistant bacteria using a statistical mixture design

Andressa Blainski^a, Barbara Gionco^b, Admilton G. Oliveira^b, Galdino Andrade^b, Ieda S. Scarminio^c, Denise B. Silva^d, Norberto P. Lopes^e, João C. P. Mello^{a,*}

^aPrograma de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Avenida Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá, PR, Brazil

^bLaboratório de Ecologia Microbiana, Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brazil

^cLaboratório de Quimiometria em Ciências Naturais, Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, PR, Brazil

^dLaboratórios de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, Brazil

^eNúcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Tel:+55 44 3011 4816. Fax: +55 44 3011 5050. E-Mail: mello@uem.br. Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá-PR, Brazil (J.C.P.Mello).

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) is commonly known as “baicuru” or “guaicuru” and preparations of its dried rhizomes have been popularly used in the treatment of premenstrual syndrome and menstrual disorder, and as an antiseptic in genito-urinary infections. This study evaluated the potential antibacterial activity of rhizome extracts against multidrug-resistant bacterial strains using statistical mixture design.

Materials and methods: The statistical design of four components (water, methanol, acetone and ethanol) produced 15 different extracts and also a confirmatory experiment, which was performed using water:acetone (3:7, v/v). The crude extracts and their ethyl-acetate fractions were tested against vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE*fm*), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae*, all of which have been implicated in hospital and community-acquired infections. The dry residue, total polyphenol, gallic acid and epigallocatechin contents of the extracts were also tested and statistical analysis was applied in order to define the fit models to predict the result of each parameter for any mixture of components. The principal component and hierarchical clustering analysis (PCA and HCA) of chromatographic data, as well as mass spectrometry (MS) analysis were performed to determine the main compounds present in the extracts.

Results: The Gram-positive bacteria were susceptible to inhibition of bacterial growth, in special the ethyl-acetate fraction of ternary extracts from water:acetone:ethanol and methanol:acetone:ethanol against, respectively, VRE*fm* (MIC = 19 µg/mL) and MRSA (MIC = 39 µg/mL). On the other hand, moderate activity of the ethyl-acetate fractions from primary (except water), secondary and ternary extracts (MIC = 625 µg/mL) was noted against KPC. The quadratic and special cubic models were significant for polyphenols and gallic acid, respectively. Fit models to dry residue and epigallocatechin were not possible. PCA and HCA of the chromatographic fingerprints were disturbed by displacement retention time of some peaks, but the ultraviolet spectra indicated the homogeneous presence of flavan-3-ols characteristic of tannins. The MS confirmed the presence of gallic acid, gallic acid, gallic acid, and epigallocatechin in extracts, and suggested the presence of monomers and dimers of B- and A-type prodelphinidins gallate, as well as a methyl gallate.

Conclusion: Our results showed the antibacterial potential of *L. brasiliense* extracts against multidrug-resistant Gram-positive bacteria, such as VRE*fm* and MRSA. The statistical design was an important tool to evaluate the biological activity by optimized form. The presence of some phenolic compounds was also demonstrated in extracts.

Keywords: *Limonium brasiliense*; multidrug-resistant bacteria; simplex centroid; mass spectrometry; prodelphinidins

Chemical compounds studied in this article: Gallic acid (PubChem CID: 370); Gallocatechin (PubChem CID: 65084); Epigallocatechin (PubChem CID: 72277)

1. Introduction

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) is a perennial herb that grows in Argentina, Uruguay, and the southern coast of Brazil. It is commonly known as “baicuru” or “guaicuru”. Preparations of its dried rhizomes have been used in the treatment of premenstrual syndrome and menstrual disorder, and as an antiseptic in genito-urinary infections. Studies report bacteriostatic, antiinflammatory and antioxidant effects and the presence of hydrolyzable and condensed tannins, leucoanthocyanins, flavonoids, β -sitosterol, saponins, and coumarin in rhizome of *L. brasiliense* (Antonelli-Ushirobira et al., 2015a-b; Cardoso, 1990; Moura, 1984; Murray et al., 2004; Rosito-Filho, 1975).

Tannins seem to be a featured chemical class from *L. brasiliense*; however, they are complex structures and the analytical data depends on several factors, including sample preparation and storage and appropriated technical of extraction (Mueller-Harvey, 2001; Schofield et al., 2001). The pharmacological or biological activities of tannins are due mainly to their ability to complex with metal ions and macromolecules such as proteins and polysaccharides, and to their free-radical scavenging ability. The presence of the A-type proanthocyanidin in herbal extracts could also contribute to the inhibition of bacterial growth through the destabilization of the cytoplasmic membrane, permeabilization of the cell membrane, inhibition of extracellular microbial enzymes with direct actions on microbial metabolism, or the deprivation of substrates required for microbial growth, especially essential mineral micronutrients. The antibacterial activity of gallotannins is attributable to their strong affinity for iron and is also related to the inactivation of membrane-bound proteins (Daglia, 2012).

The Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium*, as well as the Gram-negative bacteria *Klebsiella pneumoniae*, are opportunistic pathogens that can cause a wide variety of diseases. They are important human pathogens associated with hospital and community-acquired infections. In the last few decades, the number and proportion of drug-resistant infections, such as vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE_{fm}), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing bacteria, has increased in many countries. Methicillin, vancomycin and carbapenem antibiotics (such as imipenem, meropenem, and doripenem) are commonly applied to treat several bacteria that have developed resistance to conventional antibiotics such as penicillin and amoxicillin. For example, vancomycin is an important antibiotic agent used to treat MRSA. The first case of vancomycin-resistant Enterococci was reported in 1988. Since then, the global concern about the health effects of multidrug-resistant

bacteria has grown substantially (Cardozo et al., 2012; McDonald et al., 1997; Souza-Lopes et al., 2016).

Therapeutic options for multidrug-resistant pathogens are extremely limited. Some investigations have demonstrated that polyphenols, like tannins and flavonoids, have a potential effect against MRSA. Polyphenols have been used in combination with antibiotics, in order to potentiate their efficacy, facilitate a lower antibiotic dose, and therefore reduce the risk of adverse reactions associated with antibiotics. One study also demonstrated a synergistic effect of epigallocatechin gallate with imipenem when treating imipenem-resistant *K. pneumoniae* (IRKP). On the other hand, the effect of tannins against VRE*fm* has not been conclusively studied (Daglia, 2012; Hatano et al., 2005; Hemaiswarya et al., 2008; Cho et al., 2011; Singh et al., 2016; Tsuchiya et al., 1996).

Although the literature shows many studies of phenolic compounds derived from different plant drugs, no studies have systematically investigated the antibacterial effects of *L. brasiliense* extracts on multidrug-resistant pathogens using a statistical mixture design. This work used a simplex centroid design involving water (*w*), methanol (*m*), acetone (*a*), and ethanol (*e*) to obtain the extracts. We measured dry residue of crude extracts, total polyphenol content, and gallic acid and epigallocatechin concentrations by HPLC-DAD (high-performance liquid chromatography with diode-array). Besides, principal component and hierarchical clustering analyses (PCA and HCA) were applied to the chromatographic fingerprints and UV-spectra in order to analyse the differences and similarities between the samples and determine the main classes for them. The chemical characterization of major substances was supported by LC-DAD-MS. All samples from the mixtures design were tested against VRE*fm*, MRSA, and KPC-producing *K. pneumoniae*, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. A selected sample was also tested by scanning electron microscopy (SEM) against MRSA and the cellular morphological alteration was evaluated.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Rhizomes of *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) were collected in Rio Grande, in the state of Rio Grande do Sul, Brazil (S 31° 59' 33"/W 52° 10' 43") in February 2013. A voucher specimen was deposited at the Herbarium of the State University of Maringá under number HUEM-27725. The plant material was collected under a permit from IBAMA-SISBIO (No. 11995-3, November 2, 2010, authentication code 46367613), under the responsibility of J. C. P. Mello. Access to the botanical material was authorized and licensed by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), registered under No. 010252/2015-0. The plant material was cleaned with water to remove soil, dried in a circulating-air oven (37 ± 2 °C) and powdered in a hammer mill (Tigre ASN-5; mean diameter 0.42 mm).

2.2. Extract preparation and simplex centroid assessment for statistical mixture design

The milled rhizomes (50.0 g) were extracted with extractor solvent (Table 1) by turbo-extraction (Ultra-Turrax[®] UTC T25, 20 min, 15,000 rpm, $t < 40$ °C) at a proportion of 10% (w/v). Three extracts of each tested solvent were prepared. The extractive solutions were filtered, transferred to a volumetric flask and diluted to 500 mL. A portion of the solutions was used for dry residue testing according to German Pharmacopeia (1986). The remaining solution was concentrated in a rotavapor (Büchi R-114) under reduced pressure and lyophilized (Christ Alpha 1-4) to obtain the crude extract (CE). The CEs (1.0 g) were then solubilized in water (10 mL) and partitioned with ethyl acetate (5 x 10 mL). The ethyl acetate fractions (FAE) were concentrated and lyophilized. All CEs were tested for total polyphenol (TP) content according to the method described for Blainski et al. (2013), and all FAEs were tested by HPLC-DAD for determination of gallocatechin (GC) and epigallocatechin (EPG) concentrations according to Blainski et al. (2016).

Statistical analysis. Mixture response surfaces, PCA and HCA were analyzed using the Statistica[®] 8.0 program (Copyright StatSoft, Inc. 1984-2007) by one-way analysis of variance (ANOVA) considering a significance levels of $P < 0.05$. The results were expressed as mean \pm standard deviation [residual standard deviation (RSD%)]. PCA and HCA were determined using a standardized columns matrix.

2.3. Identification of the constituents by LC-DAD-MS

The analyses were carried out on a Shimadzu Prominence UFLC coupled to a diode array detector (SPD-M20A, Shimadzu) and mass spectrometer (AmaZon SL and MicrOTOF-Q III - Bruker Daltonics, Billerica, USA) with electrospray ionization (ESI). The analyses followed the chromatographic conditions: flow rate of 0.8 mL/min; mobile phase consisted by water (A) and acetonitrile (B), both with formic acid (0.1%, v/v); elution gradient was 0 min 10% B, 15 min 15% B, 35 min 19% B, 36 min 80% B, 44 min 80% B, 45 min 10% B, 52 min 10% B; oven temperature of 30 °C; column was an Agilent Zorbax C-18 (250 mm x 4.6 mm, 5 μ m). The FAE samples were prepared in water:methanol (8:2, v/v) at a concentration of 1 mg/mL, filtered on a 0.22 μ m x 3.0 mm (Millex[®], Millipore) PTFE membrane and injected at a volume of 20 μ L. Electrospray ionization source was used in positive mode and negative mode over a mass range of m/z 100–1200 and 1000–2000 using the following instrument settings: nebulizer gas nitrogen of 725 bar; dry gas nitrogen of 9 L/min and of 300 °C; capillary voltage 3.0 kV; end plate offset 500 V. The MS/MS analysis was carried out in automatic mode. Helium gas was used as a collision gas. The total ion chromatograms (TIC) were recorded by alternating automatic events in the ion trap analyzer.

2.4. Evaluation of antibacterial activity using *in vitro* tests

2.4.1. Bacterial strain and culture conditions.

In this study, the VRE*fm* 170 and KPC-producing *K. pneumoniae* 97 clinical isolates were obtained from the Londrina University Hospital. The *E. faecium* strain (ATCC 6569) was provided by Dr. Sueli Fumie Yamada Ogatta (Londrina State University, Londrina –PR, Brazil). The methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) N315, *S. aureus* (ATCC 29123), and *K. pneumoniae* (ATCC 10031) strains are deposited in the Microbial Culture Collection of Laboratory of Bacteriology Basic and Applied Laboratory of State University of Londrina (Department of Microbiology, Biological Sciences Center). The resistance profiles of the isolated 170 VRE*fm*, MRSA N315 and 97 KPC are described in Table 2. The strain was stored in sterile Mueller Hinton Broth cation adjusted (MHB) at -20 °C, with 30% glycerol. The bacteria were routinely maintained at 4 °C on Mueller Hinton-agar (MHA) plates and subcultivated in MHA medium at 37 °C prior to each assay.

2.4.2. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The 16 CEs, as well as their FAEs, produced from the simplex centroid design were evaluated for antimicrobial activity. The MIC was determined according to the procedures outlined by the CLSI (2015) at a final inoculum of 5×10^4 colony forming units (CFU)/mL. Serial two-fold dilutions of the fractions (CEs and FAEs) were performed in a microdilution plate (96 wells) containing 100 μ L of sterile MHB. Next, the inoculum was added to each well and the microplates were incubated at 37 °C for 24 h. The MIC was defined as the lowest concentration of the fractions that resulted in the inhibition of growth. Each experiment was performed in triplicate and repeated three times. Stock solutions of the fractions were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich®) and tested at concentrations from 1,250 to 2.4 μ g/mL. The solution was sterilized with a 0.2 μ m PES-membrane filter (Filtropur S 0.2, Sarstedt AG & Co., Germany). The effect of DMSO alone was evaluated and did not affect the antibacterial activity.

2.4.1. Scanning electron microscopy (SEM)

Based on its MIC activity against MRSA N315, sample 14-FAE was selected for SEM analysis. Colonies of MRSA N315 grown in MHA (24 h, 37 °C) were transferred to MHB and the cell density was adjusted to 3×10^6 CFU/mL. One milliliter of the cell suspension was distributed in two tubes. The first tube (the control) contained the culture without the sample (14-FAE). The second tube (the test sample) contained sample 14-FAE at its MIC concentration (39 μ g/mL). Both cultures were incubated at 37 °C, 150 rpm for 6 h. After incubation, 10 μ L of each culture was placed onto poly-L-lysine-coated glass slides and fixed by immersion in 2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, post-fixed in 1% OsO₄ for 1 h, and dehydrated in an ethanol series (30,

50, 70, 90, and 100 °Gay-Lussac). Samples were dried with hexamethyldisilazane (HMDS; Sigma-Aldrich), coated with gold (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and observed under a scanning electron microscope (FEI Quanta 200).

3. Results and discussion

3.1. Simplex centroid assessment for statistical mixture design

Table 1 shows the effects of the solvent compositions on the assessed parameters (such as dry residue, TP, GC and EGC contents) of *L. brasiliense*. The effects of the solvent compositions on the extractive process can be seen by comparing the average of the dry residue. In general, the pure acetone presented the lowest result ($5.1\% \pm 0.40$ [7.8%]) and the water:ethanol mixture presented the highest result ($32.7\% \pm 3.69$ [11.3%]). In contrast to the dry residue, the extraction with pure acetone presented the highest TP ($37.5\% \pm 0.46$ [1.2%]), but the lowest gallic acid (GC) ($3.1\% \pm 0.18$ [5.9%]) and epigallocatechin concentrations (EGC) ($2.1\% \pm 0.16$ [7.7%]), and pure water produced the lowest TP ($18.9\% \pm 0.68$ [3.6%]), but the highest GC ($7.9\% \pm 0.39$ [5.0%]) and EGC ($19.6\% \pm 0.69$ [3.5%]).

Response surfaces (Figure 1) were determined for dry residue, TP content, GC and EGC as a function of the extraction solvent compositions. In all cases, linear, quadratic and special cubic models were tested. Lack of fit at the 95% confidence level for these surfaces was evaluated with ANOVA and confirmatory experiments were performed in the region previously considered to have desirable results.

All models showed significant for dry residue data ($p < 0.01$), but no model was a suitable fit. The lack of fit suggests to perform four other experiments (extraction solvents in proportion of 5/8:1/8:1/8:1/8), which would increase the number of terms in the equation and enable the statistical analysis of a full cubic model. These experiments were performed and the full cubic model was analyzed. The equation to calculate the dry residue is given by:

Dry residue

$$= 20.9 w + 22.5 m + 5.2 a + 17.1 e + 21.7 wm + 60.5 wa + 56.6 we + 19.1 ma - 11.1 me + \\ + 18.6 ae - 83.8 wme + 178.2 wae - 113.9 wm(w - m) + 73.3 we(w - e) \\ (\pm 1.1) (\pm 1.1) (\pm 1.1) (\pm 1.1) (\pm 5.2) (\pm 5.2) (\pm 5.5) (\pm 4.8) (\pm 5.2) \\ (\pm 5.2) (\pm 36.1) (\pm 36.1) (\pm 31.2) (\pm 27.0)$$

Where w is water, m is methanol, a is acetone and e is ethanol.

Although, the full cubic model was significant, there was lack of fit. No tendency could be seen based on the distribution of results (observed vs. predicted values), but the lack of fit was inadequate ($p < 0.01$). In order that, the confirmatory experiment ($29.4\% \pm 1.07$ [3.6%]) presented

different than it could wait with the equation (22.6%) and no equation can be used for predicting this parameter.

The quadratic model for TP showed suitable ($p < 0.01$) and no significant lack of fit ($p = 0.175$). The following equation can be used to predict the TP content in crude extracts; the predicted TP for the confirmatory sample (32.0%) corresponds to the experimental result ($29.2\% \pm 0.21$ [0.7%]). The equation to calculate the TP content is given by:

Total Polyphenol

$$= 19.1 w + 25.7 m + 37.6 a + 25.9 e + 11.0 wm + 13.1 we - 9.0 ma + 3.7 me - 10.3 ae$$

$$= \begin{matrix} (\pm 0.3) & (\pm 0.3) & (\pm 0.3) & (\pm 0.3) & (\pm 1.3) & (\pm 1.3) & (\pm 1.3) & (\pm 1.3) & (\pm 1.3) \end{matrix}$$

Where w is water, m is methanol, a is acetone and e is ethanol.

By term coefficients of equation, it note the antagonistic effect from methanol:acetone mixture and acetone:ethanol mixture on the TP content. A simplex centroid study using the same extraction solvents for *Trichilia catigua* A. Juss. evaluated the TP content in these extracts and found that the acetone:ethanol mixture was synergic and only methanol:acetone and methanol:ethanol were antagonistic (Lonni et al., 2012). This suggests a strong influence of plant matrices on the ability of solvents to extract TP from hebal drugs. The extractability of tannins can depend on the seasonal maturity of tissues and on the type of plants or tannins. Several solvents have been used to extract tannins from hebal drugs, mainly acetone, methanol and water. Methanol tends to be a better solvent for low molecular weight structures or for tissues that contain large amounts of enzymes, such as bark or fruits; however 50–70% aqueous acetone is a better solvent than water or methanol for extracting hydrolyzable tannins. The solubility of tannins is surprisingly variable and some tannins, including higher molecular weight tannins and those bound to fibre, may be insoluble in the main solvents (Mueller-Harvey, 2001; Schofield et al., 2001).

The special cubic model for GC and EGC showed significant ($p < 0.01$) and non significant lack of fit ($p = 0.376$ and $p = 0.155$, respectively). The equation can be used to predict the GC content in FAE; the predicted GC for the confirmatory sample (3.5%) was consistent with the experimental result ($3.4\% \pm 0.10$ [3.0%]). On the other hand, the predicted result for EGC (1.0%) was different from the experimental result ($3.7\% \pm 0.07$ [2.6%]). This difference seems be related to the result of EGC with pure water, which is higher than all other samples, therewith the variety of values from other samples was low and not enough to statistical mixture design analysis. The equations to calculate the concentration of GC and EGC are given by:

Gallocatechin

$$= 7.9 w + 3.7 m + 3.1 a + 4.2 e - 5.5 wm - 5.1 wa - 6.0 we + 3.3 ma + 2.6 me -$$

$$= \begin{matrix} (\pm 0.1) & (\pm 0.1) & (\pm 0.1) & (\pm 0.1) & (\pm 0.7) & (\pm 0.7) & (\pm 0.7) & (\pm 0.7) & (\pm 0.7) \\ & & & & -15.0 wma & -14.3 wme & -13.9 mae & & \\ & & & & (\pm 4.7) & (\pm 4.7) & (\pm 4.4) & & \end{matrix}$$

Epigallocatechin

$$= 19.6 w + 2.8 m + 2.2 a + 3.0 e - 8.5 wm - 30.4 wa - 28.8 we - 24.8 wma -$$

$$\begin{matrix} (\pm 0.3) & (\pm 0.2) & (\pm 0.2) & (\pm 0.2) & (\pm 1.4) & (\pm 1.4) & (\pm 1.4) & (\pm 8.6) \\ & & & & -34.7 wme & + 36.1 wae & & \\ & & & & (\pm 8.6) & (\pm 8.6) & & \end{matrix}$$

Where w is water, m is methanol, a is acetone and e is ethanol.

Anyway, for both parameter (GC and EGC), an antagonistic effect for GC and EGC contents of every solvent on the pure water extraction was observed. Interestingly, pure acetone gave a strong antagonistic effect despite having the highest TP content. The chromatograms (Figure 2) also showed that pure water favoured the production of peaks **1**, **2**, and **3**, corresponding to gallic acid, GC, and EGC, respectively, but not other peaks and has no extractability for peaks **7** and **8**, if we compare to other sample. About the extractability of solvent, it was observed that the peak **5** was presence only in sample 5 (water:methanol).

PCA was applied to the chromatographic fingerprints from all 15 FAE samples obtained using the mixture design by detection of peaks at 210 nm. The data matrix had dimensions of 15 x 4828 corresponding to an analysis time between 9 to 41 min. It was possible to obtain a classification model with 5 factors, which explain 95.4% of the total variance. The corresponding 15 x 15 matrix containing all the interpoint distances was determined and HCA was carried out. Both PCA and HCA results were evaluated complementarily in order to verify which samples would have different fingerprint in relation with extractive solvents. We could distinguish five groups (Figure 3). The evaluation of score table demonstrated that Factor 1 was representative of Group 1, and Factor 2 was representative of Group 3. According to the loading graph, the peaks at 19.0, 28.9, and 37.5 min were relatively bigger in Group 1 than Groups 2 and 3. Although the statistical analysis showed some differences among the groups, it is important to note that this evaluation seems to have been disturbing by a significant displacement retention time among chromatogram, because the verification of all fingerprints showed a good similarity, except by samples 1 (pure water) and 5 (water:methanol), that had already commented by Figure 2.

The PCA was also applied to the UV spectral profiles of the apices of each peak for the chromatogram from sample 5 (water:methanol), because this sample showed the highest number of detected peaks (a total of 25) between 9 and 41 min. The data matrix had dimensions of 25 x 91, corresponding to absorbance at the 220–400 nm wavelength intervals. It was possible to obtain a classification model with 2 factors, which explain 99.8% of the total variance. The corresponding 25 x 25 matrix containing all the interpoint distances was determined and HCA was carried out. The complementary evaluation by PCA and HCA was performed in order to verify the characteristic spectra of each peak and to propose the compound classes present in *L. brasiliense*. It was possible to distinguish two groups of spectra (Figure 4). The evaluation of score table demonstrated that Factor 1 was representative of Group 1, and Factor 2 was representative of Group 2. Group 2 corresponded to

peaks **1** (gallic acid) and **5**, which both show the λ_{\max} at 274 nm. Group 1 corresponded to all others peaks, which show the λ_{\max} at 270 to 278 nm and others weak bands at 318 to 366, including the peaks **2** (GC) and **3** (EGC) with λ_{\max} at 275 nm and weak bands at 330 and 344 nm. These UV profiles are characteristic of flavan-3-ols structures, which show mainly one λ_{\max} at around 270–290 nm (Band II) and low λ_{\max} at around 320 nm (Band I), probably caused by the lack of conjugation between ring B and the rest of the molecule (Vihakas, 2014).

3.2. Identification of the constituents of the extracts by LC-DAD-MS

All the extracts were analyzed by LC-DAD-MS and MSⁿ to determine the similarity of the most of samples and to identify their constituents. The chromatograms at 270 nm and the total ion chromatograms are illustrated in the Supporting Information (Appendices A and B), which were observed similarities between the chemical profiles of the extracts, but the aqueous extract was significant differences when compared to them.

The analyses by LC-DAD-MS and MSⁿ, including high resolution mass spectrometry data, enabled the identification of eight main compounds in the extracts, most of which were gallic acid and prodelphinidin derivatives possessing B-type linkage and B-type doubly bonded or A-type structures (Table 3, Figure 5). These compounds also showed different distributions in the extracts (Appendices A and B). The chromatographic peaks **1** and **5** showed absorption bands at 274 and 273 and deprotonated ions at m/z 169.0140 and 183.0307 [M-H]⁻ compatible with C₇H₅O₅⁻ (error: 1.6 ppm) and C₈H₇O₅⁻ (error: 4.6 ppm), respectively. The fragment ions produced from the losses of 44 *u* and 15 *u* confirmed the presence of acid and methyl groups, which all the data are agreed with the data described in the literature for gallic acid (**1**) and methyl gallate (**5**) (Erşan et al., 2016).

The chromatographic peaks **2** and **3** exhibited the ion at m/z 305 [M-H]⁻, suggesting a flavan-3-ol monomer, which presented a similar fragmentation pathway and they are confirmed by the authentic standard injections as galloocatechin and epigallocatechin, respectively. In addition, compound **7** showed an intense ion at m/z 457.0782 ([M-H]⁻, C₂₂H₁₇O₁₂⁻) and products ions yielded from losses of 152 and 170 *u* in the MS², which are relative to losses of a galloyl unit and subsequently of a molecule of water. So, the data confirmed that peak **7** represented a monomer of prodelphinidin linked to a galloyl unit, and the results are compatible with previously published data (Erşan et al., 2016; Guaratini et al., 2014).

The other main compounds (peaks **4**, **6**, and **8**) of the extracts revealed ions in the MS spectra compatible with dimers and linked to one or two galloyl units. The presence of galloyl units were confirmed by the losses of 152 *u* (galloyl) and the prodelphinidin units were confirmed by the losses of 168 and 305 *u*. All the data were compatible with the described to them, including for the A- and B-type linkages between the units. Compound **4** was identified as a dimer of the prodelphinidin with one galloyl and a B-type linkage and compounds **6** and **8** were identified as containing one and two galloyl

unit, respectively, and may contain A-type linkage or B-type with double bonded structure (Erşan et al., 2016; Guaratini et al., 2014; Li and Deinzer, 2007; Lin et al., 2000; Nonaka et al., 1992).

Phenolic substances are largely distributed in plants from the genus *Limonium*. The aqueous extract from *L. wrightii* (Hance) Kuntze was shown to contain gallic acid, which was related to its antiradical potential and ability to reduce of hepatic toxicity (Aniya et al., 2002). Gallic acid, as well as epigallocatechin gallate, were present in methanol extracts from *L. algarvense* Erben. and contributed to the antiradical potential and antiinflammatory effects of these extracts (Rodrigues et al., 2015; Rodrigues et al., 2016). The monomers and dimeric prodelphinidins galocatechin, epigallocatechin, 3,5,7,3',4',6'-hexahydroxyflavone, epigallocatechin gallate, 2*R*,3*R*,4*R*-(-)-epigallocatechin-(4 β →8)-2*R*,3*R*-(-)-epigallocatechin gallate and 2*R*,3*R*,4*R*-(-)-epigallocatechin-(4 β →8)-2*R*,3*R*,3,5,7,3',4',6'-hexahydroxyflavan were identified in hydroalcoholic extracts from *L. gmelinii* (Willd.) Kuntze; this plant showed antiradical potential and a clinical antiexudative effect (Korul'kina et al., 2004a; Stankovic et al., 2015; Zhusupova, 2006; Zhusupova and Abil'kaeva, 2006a-b). *L. sinense* (Girard) Kuntze, which was shown to be active against the Herpes Simplex Type-1, showed the presence of samarangenin B, a B-type dimeric prodelphinidin with double bonded galloyl units (Lin et al., 2000; Kuo et al., 2002). The activity against the Herpes Simplex Type-1 was also shown in ethanol extracts from *L. brasiliense* (Faral-Tello et al., 2012). An ethanol extract from *L. sinense* was also shown to be effective against the Hepatitis C virus (Hsu et al., 2015).

Flavonoids such as quercetin, myricetin, myricetrin, 3-*O*- β -D-(6"-galloyl)-galactopyranoside, myricetin 3-*O*- β -D-galactopyranoside, myricetin 3-*O*- β -D-glucopyranoside, myricetin 3-*O*- β -D-(6"-galloyl)-glucopyranoside, myricetin 3-*O*- α -L-(2'-galoyl)-arabinopyranoside (Korul'kina et al., 2004b; Zhusupova and Abil'kaeva, 2006b) have been isolated from *L. gmelinii* and *L. popovii* Kubank. Myricetin derivatives have been isolated from *L. sinuatum* (L.) Mill and *L. meyeri* (Boiss.) Kuntze (Movsumov and Garaev, 2005; Ross, 1984). Fourteen flavonoids, including myricetin and quercetin and their derivatives homoeriodictyol, naringenin, eriodictyol and Kaempferol were identified from *L. aureum* (L.) Hill, and 9 flavonoids, including the myricetin derivatives phloridzin and tyramine were present in *L. caspium* (Willd.) P. Fourn.; and some were also shown to be active against yeast, malaria and leishmania (Gadetskaya et al., 2015; Ye and Huand, 2006). Myricetin derivatives were also identified in *L. aureum* (L.) Hill, which showed antiradical potential (Geng et al., 2015).

The rhizoma of *L. brasiliense* have been shown to contain flavan-3-ol, flavan-3,4-ols, ellagic acid, gallic acid, epicatechin, condensed and hydrolyzable tannins, 4-methyl gallate, myricetin, coumarin, β -sitosterol, and triterpenoid saponins (Cardoso, 1990; Moura, 1984; Rosito-Filho, 1975). Recently, myricetin-3-*O*-rhamnoside, myricetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside, gallic acid, galocatechin, epigallocatechin, and epigallocatechin gallate were identified in extract of *L. brasiliense*, and the extract showed antiradical potential, antiinflammatory activity, and antiestrogen action (Murray et al., 2004; Rodriguez et al., 2011).

3.3. Evaluation of antibacterial activity

Table 4 shows the results of samples produced using the statistical mixture design against standard and resistant strains of *E. faecium*, *S. aureus* and *K. pneumoniae*.

The MIC procedure was important to evaluate the activity of samples. The FAE of all samples showed some effect against VRE fm , MRSA and KPC-producing *K. pneumoniae*. According to Holetz et al. (2002), an MIC less than 100 $\mu\text{g/mL}$ is considered to be “susceptible”, from 100 to 500 $\mu\text{g/mL}$ represents “good activity”, from 500 to 1000 $\mu\text{g/mL}$ indicates “moderate activity” and over 1000 $\mu\text{g/mL}$ represents an “inactive” substance. Based on this classification system, the results showed that VRE fm was susceptible to all FAE samples ($< 78 \mu\text{g/mL}$), except sample 1 (pure water – 156.5 $\mu\text{g/mL}$ – which showed good activity). Interestingly, sample 13 (water:acetone:ethanol) with lowest MIC (39 $\mu\text{g/mL}$) for CE against both *E. faecium* ATCC and VRE fm , besides the excellent result (19 $\mu\text{g/mL}$) for FAE (Figure 2C – chromatographic fingerprint). About the confirmatory sample (water:acetone, 3:7, v/v), the VRE fm was also susceptible to FAE (39 $\mu\text{g/mL}$), but showed only good activity to CE (156.5 $\mu\text{g/mL}$). The diffusion in agar test (data no showed) complied with the MIC results and only sample 1 (FAE and CE) showed no inhibition zone, while all other samples generally showed a larger inhibition zone for FAE (8.7–13.5 mm) than CE (7.5–10.5 mm).

Similar MIC results could be realized against *S. aureus* and MRSA, both of which were susceptible to all FAE samples ($< 78 \mu\text{g/mL}$), except the FAE from sample 15 (water:methanol:acetone:ethanol – 156.5 $\mu\text{g/mL}$ – which showed good activity). In contrast to *E. faecium*, the CE samples showed good activity against *S. aureus* (156.5 to 312.5 $\mu\text{g/mL}$). The FAE of sample 14 (methanol:acetone:ethanol) showed the best potential against MRSA (MIC = 39 $\mu\text{g/mL}$) (Figure 2D – chromatographic fingerprint). In the SEM evaluation, the control (untreated MRSA N315) showed a large number of spherical cells that were uniform in size cells (Figure 6A). Under high magnification, was observed structures and arrangements in grape-like clusters intact (Figure 6B). For MRSA N315 treated with sample 14-FAE, the number of cells was reduced compared to the control (Figure 6C). Under high magnification, was confirmed the physical damage and considerable morphological alterations were observed on the cell surface, including blebbing, protrusions and shapeless masses (Figure 6D). The antimicrobial activity of polyphenolic compounds is due to the inactivation of certain cellular enzymes, which depend on the level of penetration of the sample into the cell, or changes in membrane permeability (Moreno et al., 2006). In general, polyphenolic compounds such as tannins, have a greater action against Gram-positive organisms than Gram-negative, probably due to structural differences on the cell surface (Cetin-Karaca, 2011). The results of our study suggest that sample 14-FAE has high penetration potential in MRSA N315, a Gram-positive microorganism, because of its chemical characteristics, causing severe physiological alterations leading to cell death.

None of the evaluated samples showed antibacterial activity against either standard or resistant strains of *K. pneumoniae*. As noted previously, the FAE samples showed lower MIC than CE (MIC > 1,250 µg/mL – inactive for CE). Most FAE samples showed a good activity (312.5 µg/mL) against the *K. pneumoniae* (ATCC 10031), except samples 1 (water pure – no activity), 15 and the confirmatory sample (water:methanol:acetone:ethanol and water:acetone 3:7, respectively – 625 µg/mL – moderate activity). A moderate activity (625 µg/mL) was demonstrated for most FAE samples against the KPC strain, except samples 1 (no activity), 15 and the confirmatory sample (1,250 µg/mL – inactive).

According to these results, we conclude that extracts from *L. brasiliense* have better antimicrobial potential against Gram-positive than Gram-negative bacteria and that these extracts show excellent antimicrobial potential against resistant strains. Rosito-Filho (1975) reported that some strains of *S. aureus* were susceptible to hydroethanolic extracts from *L. brasiliense* in a disc diffusion test (inhibition zone \geq 10 mm). The same test with *L. delicatulum* (Girard) Kuntze shoots showed no activity for aqueous extracts, moderate activity for methanol and acetone extracts against *S. aureus* and good activity of ethanol extract against *S. aureus* and *E. faecium* (Medini et al., 2014). These results support the traditional use of these extracts as antiseptics and our results show the high potential for use against drug-resistant bacterial strains.

Few studies have reported the antimicrobial potential of plant-derived drugs against multidrug-resistant bacterial strains. About the tannins, the synergism for antibacterial and proteomic effect of epigallocatechin gallate with imipenem was showed on IRKP by calculation of fractional inhibitory concentration, whose values were lesser than 0.5 (Cho et al., 2011).

Considering the acceptable MIC value to screen of herbal preparation and the previous studies in this matter, we report that different FAE extracts from *L. brasiliense* displayed activity against multidrug-resistant bacteria, particularly against Gram-positive bacteria. The systematic study of simplex centroid design permitted us to objectively evaluate the extract with best effect, considering that mixture of many solvents for extractive process is not often common in the laboratory routine. Besides, the reports related the traditional use of aqueous and/or (hydro)alcoholic extracts, as infusion and decoction; the mixture design allowed us to perform an ethnopharmacological investigation, as well as to extrapolate for other possibilities of active extract. However, a direct correlation between the antibacterial activity and the tested parameters for statistical mixture design (dry residue, TP, GC and EGC contents) was not found; although the influence of the complex chemical composition on this activity was clear.

L. brasiliense seems be a good therapeutic option for medicinal development against multidrug-resistant bacteria, as an antibiotic or as an adjunct in association with other antibiotics, or as a potential active to use in treatment protocol known as collateral sensitivity cycling, by using sequential of different drug in order to decrease the exposure time to individual drug, and therewith, avoiding the resistance frequencies (Imamovic and Sommer, 2013).

4. Conclusion

In conclusion, the simplex centroid design presented models well fit for the TP and GC contents. For dry residue it was not possible to obtain a significant and fitted model, even with statistical analysis using a full cubic model. Lastly, EGC content was influenced by the strong antagonistic effect of every solvent on the pure water extraction related to EGC. We confirmed the antibacterial activity of *L. brasiliense* and demonstrated that VRE β m and MRSA were susceptible (MIC < 78 μ g/mL) to the FAEs from several samples. The MS analysis confirmed the presence of gallic acid, GC, and EGC and suggested the presence of monomers and dimers of B- and A-type prodelphinidins gallate, as well as a methyl gallate in extracts from rhizomes of *L. brasiliense*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank A. Arantes for technical support during the experiments and Aché Laboratórios Farmacêuticos for providing the UV- and HPLC-Laboratories for analytical experiments. This study received support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Higher Education Staff Development Coordination (CAPES), FINEP, Araucária Foundation, FAPESP, and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if).

REFERENCES

- Aniya, Y.; Miyagi, C.; Nakandakari, A.; Kamiya, S.; Imaizumi, N.M.; Ichiba, T., 2002. Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. *Phytomedicine*, 9, 239–244.
- Antonelli-Ushirobira, T.; Blainski, A.; Gancedo, N.C.; Gaburo, F.; Cardoso, K.A.K.C.; Leite-Mello, E.V.S.; Mello, J.C.M.; Milaneze-Gutierrez, M.A., 2015a. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 25, 320–327.
- Antonelli-Ushirobira, T.; Blainski, A.; Fernandes, H.G.; Moura-Costa, G.F.; Costa, M.A.; Campos-Shimada, L.B.; Salgueiro-Pagadigorria, C.L.; Kaneshima, E.N.; Becker, T.C.A.; Leite-Mello, E.V.S.; Mello, J.C.P., 2015b. Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.*, 174, 293–298.
- Blainski, A.; Lopes, G.C.; Mello, J.C.P., 2013. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. *Molecules.*, 18, 6852–6865.
- Blainski, A.; Antonelli-Ushirobira, T.M.; Godoy, G.; Leite-Mello, E.V.S.; Mello, J.C.P., 2016. Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of total phenolic content from *Limonium brasiliense*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, Accept to publication.
- Cardoso, M.L.C., 1990. *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae (Baicuru): Desenvolvimento galênico de extratos. Master Dissertation, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p 146.
- Cardozo, V.F.; Oliveira, A.G.; Nishio, E.K.; Perugini, M.R.R.; Andrade, C.G.T.J.; Silveira, W.D.; Durán, N.; Andrade, G.; Kobayashi, R.K.T.; Nakazato, G., 2012. Antibacterial activity of

- extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 12:12, 1-8.
- Cetin-Karaca, H., 2011. Evaluation of natural antimicrobial phenolic compounds against foodborne pathogens. Master Dissertation, University of Kentucky, Lexington, p 652.
- Cho, Y.S.; Oh, J.J.; Oh, K.H., 2011. Synergistic anti-bacterial and proteomic effect of epigallocatechin gallate on clinical isolates of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Phytomedicine*, 18, 941–946.
- CLSI., 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard (M07-A10). Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotech.*, 23, 174–181.
- Erşan, S.; Üstündağ, O.G.; Carle, R.; Schweiggert, R.M., 2016. Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls (Exo- and Mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MSⁿ. *J. Agric. Food Chem.*, 64, 5334–5344.
- Faral-Tello, P.; Mirazo, S.; Dutra, C.; Pérez, A.; Geis-Asteggiante, L.; Frabasile, S.; Koncke, E.; Davyt, D.; Cavallaro, L.; Heinzen, H.; Arbiza, J., 2012. Cytotoxic, virucidal, and antiviral activity of South American plant and algae extracts. *Sci. World J.*, 2012, 1–5.
- Gadetskaya, A.V.; Tarawneh, A.H.; Zhusupova, G.E.; Gemejiyeva, N.G.; Cantrell, C.L.; Cutler, S.J.; Ross, S.A., 2015. Sulfated phenolic compounds from *Limonium caspium*: Isolation, structural elucidation, and biological evaluation. *Fitoterapia*, 104, 80–85.
- Geng, D.; Chi, X.; Dong, Q.; Hu, F., 2015. Antioxidant screening in *Limonium aureum* by optimized on-line HPLC–DPPH assay. *Ind. Crops. Prod.*, 67, 492–497.
- German Pharmacopeia. 9 ed. Wissenschaftliche:Stuttgart, 1986.
- Guaratini, T.; Armelini, A.I.S.P.V.; Ferrari, C.R.; Schefer, R.R.; Neto, A.P.; Navas, R.; Reigada, J.B.; Silva, D.B., 2014. Application of matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight LIFT for identification of cocoa condensed tannins. *J. Mass Spectrom.*, 49, 251–255.
- Hatano, T.; Kusuda, M.; Inada, K.; Ogawa, T.; Shiota, S.; Tsuchiya, T.; Yoshida, T., 2005. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 66, 2047–2055.
- Hemaiswarya, S.; Kruthiventi, A.K.; Doble, M., 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, 15, 639–652.
- Holetz, F.B.; Pessini, G.L.; Sanches, N.R.; Cortez, D.A.G.; Nakamura, C.V.; Dias-Filho, B.P., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian Folk Medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 97, 1027–1031.
- Hsu, W.C.; Chang, S.P.; Lin, L.C.; Li, C.L.; Richardson, C.D.; Lin, C.C.; Lin, L.T., 2015. *Limonium sinense* and gallic acid suppress hepatitis C virus infection by blocking early viral entry. *Antiviral Res.*, 118, 139–147.
- Imamovic, L.; Sommer, M.O.A., 2013. Use of collateral sensitivity networks to design drug cycling protocols that avoid resistance development. *Sci. Transl. Med.*, 5, 1-10, DOI: 10.1126/scitranslmed.3006609.
- Korul'kina, L.M.; Zhusupova, G.E.; Schults, E.E.; Erzhanov, K.B., 2004a. Fatty-acid composition of two *Limonium* plant species. *Chem. Nat. Compd.*, 40, 417–419.
- Korul'kina, L.M.; Schults, E.E.; Zhusupova, G.E.; Abilov, Z.A.; Erzhanov, K.B.; Chaudri, M.I., 2004b. Biologically active compounds from *Limonium gmelinii* and *L. popovii*. *Chem. Nat. Compd.*, 40, 465–471.

- Kuo, Y.C.; Lin, L.C.; Tsai, W.J.; Chou, C.J.; Kung, S.H.; Ho, Y.H., 2002. Samarangenin B from *Limonium sinense* suppresses herpes simplex virus type 1 replication in Vero cells by regulation of viral macromolecular synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46, 2854–2864.
- Kuroda, M.; Ohta, T.; Uchiyama, I.; Baba, T.; Yuzawa, H.; Kobayashi, I.; Cui, L.; Oguchi, A.; Aoki, K.; Nagai, Y.; Lian, J.; Ito, T.; Kanamori, M.; Matsumaru, H.; Maruyama, A.; Murakami, H.; Hosoyama, A.; Mizutani-Ui, Y.; Takahashi, N.K.; Sawano, T.; Inoue, R.; Kaito, C.; Sekimizu, K.; Hirakawa, H.; Kuhara, S.; Goto, S.; Yabuzaki, J.; Kanehisa, M.; Yamashita, A.; Oshima, K.; Furuya, K.; Yoshino, C.; Shiba, T.; Hattori, M.; Ogasawara, N.; Hayashi, H.; Hiramatsu, K., 2001. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 357, 1225–1240.
- Li, H.J.; Deinzer, M.L., 2007. Tandem mass spectrometry for sequencing proanthocyanidins. *Anal. Chem.*, 79, 1739–1748.
- Lin, L.C.; Kuo, Y.C.; Chou, C.J., 2000. Anti-herpes simplex virus type-1 flavonoids and a new flavanone from the root of *Limonium sinense*. *Planta Med.*, 66, 333–336.
- Lonni, A.A.S.G.; Longhini, R.; Lopes, G.C.; Mello, J.C.P.M.; Scarminio, I.S., 2012. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Anal. Chim. Acta*, 719, 57–60.
- McDonald, L.C.; Kuehnert, M.J.; Tenover, F.C.; Jarvis, W., 1997. Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: Prevalence, sources, and public health implications. *Emerg. Infect. Dis.*, 3, 311–317.
- Medini, F.; Fellah, H.; Ksouri, R.; Abdelly, C., 2014. Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. *J. Taibah Univ. Sci.*, 8, 216–224.
- Moreno, S.; Scheyer, T.; Romano, C.S.; Vojnov, A.A., 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic. Res.*, 40, 223–231, <http://dx.doi.org/10.1080/10715760500473834>
- Moura, T.F.A.L., 1984. Sobre o *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, o baicuru da Farmarmacopeia Brasileira. Master Dissertation, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p 146.
- Movsumov, I.S.; Garaev, E.A., 2005. Flavonoids from *Limonium meyeri*. *Chem. Nat. Compd.*, 41, 348.
- Mueller-Harvey, I., 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 91, 3–20.
- Murray, A.P.; Rodriguez, S.; Frontera, M.A.; Tomas, M.A.; Mulet, A.C., 2004. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z. Naturforsch.C.*, 59c, 477–480.
- Nonaka, G.I.; Aiko, Y.; Aritake, K.; Nishoka, I., 1992. Tannins and related compounds. CXIX. 1) Samarangenins A and B, novel proanthocyanidins with doubly bonded structures, from *Syzygium samarangens* and *S. aqueum*. *Chem. Pharm. Bull.*, 40, 2671–2673.
- Rodrigues, M.J.; Neves, V.; Martins, A.; Rauter, A.P.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.F.; Varela, J.; Barreira, L.; Custódio, L., 2016. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of *Limonium algarvense* flowers' infusions and decoctions: A comparison with green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chem.*, 200, 322–329.
- Rodrigues, M.J.; Soszynski, A.; Martins, A.; Rauter, A.P.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.F.; Varela, J.; Barreira, L.; Custódio, L., 2015. Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Ind. Crops Prod.*, 77, 315–322.

- Rodriguez, S.A.; Vina, M.D.; Murray, A.P.; Leiro, J.M., 2011. Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Planta Med.*, 77, 1323–1323.
- Rosito-Filho, J., 1975. Contribuição à análise das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.). Master Dissertation, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p 39.
- Ross, S.A., 1984. Myricetin-3' methyl ether-7-glucoside from *Limonium sinuatum*. *J. Nat. Prod.*, 47, 862–864.
- Ruzon, F.I.; de Paula, S.B.; Kanoshiki, R.L.; Pereira-Santos, J.; Kerbauy, G.; Kobayashi, R.K.; Yamauchi, L.M.; Perugini, M.R.; Yamada-Ogatta, S.F., 2010. Virulence determinants in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* vanA isolated from different sources at University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil. *J. Microbiol.*, 48, 814-21.
- Schofield, P.; Mbugua, D.M.; Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Tech.*, 91, 21–40.
- Singh, J.P.; Kaur, A.; Singh, N.; Nim, L.; Shevkani, K.; Kaur, H.; Arora, D.S., 2016. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of jambolan (*Syzygium cumini*) fruit polyphenols. *LWT-Food Sci. Technol.*, 65, 1025–1030.
- Souza-Lopes, A.C.; Rodrigues, J.F.; Cabral, A.B.; Silva, M.E.; Leal, N.C.; Silveira, V.M.; Morais-Júnior, M.A., 2016. Occurrence and analysis of *irp2* virulence gene in isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. From microbiota and hospital and community-acquired. *Microb. Pathog.*, 96, 15-19, doi: 10.1016/j.micpath.2016.04.018.
- Stankovic, M.S.; Petrovic, M.; Godjevac, D.; Stevanovic, Z.D., 2015. Screening inland halophytes from the central Balkan for their antioxidant activity in relation to total phenolic compounds and flavonoids: Are there any prospective medicinal plants? *J. Arid. Environ.*, 120, 26–32.
- Tsuchiya, H.; Sato, M.; Miyazaki, T.; Fujiwara, S.; Tanigaki, S.; Ohyama, M.; Tanaka, T.; Iinuma, M., 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.*, 50, 27–34.
- Vihakas, M., 2014. Flavonoids and other phenolic compound: characterization and interaction with lepidopteran and sawfly larvae. Doctor Thesis, University of Turku, Turku, p 135.
- Ye, G.; Huang, C., 2006. Flavonoids of *Limonium aurium*. *Chem. Nat. Compd.*, 42, 232–234.
- Zhusupova, G.E., 2006. Amino-acid and mineral composition of substances from the aerial part and roots of *Limonium gmelinii*. *Chem. Nat. Compd.*, 42, 123–124.
- Zhusupova, G.E.; Abil'kaeva, S.A., 2006a. Dimeric prodelphinidins from *Limonium gmelinii* roots - III. *Chem. Nat. Compd.*, 42, 164–168.
- Zhusupova, G.E.; Abil'kaeva, S.A., 2006b. Flavones from *Limonium gmelinii* - II. *Chem. Nat. Compd.*, 42, 112–113.

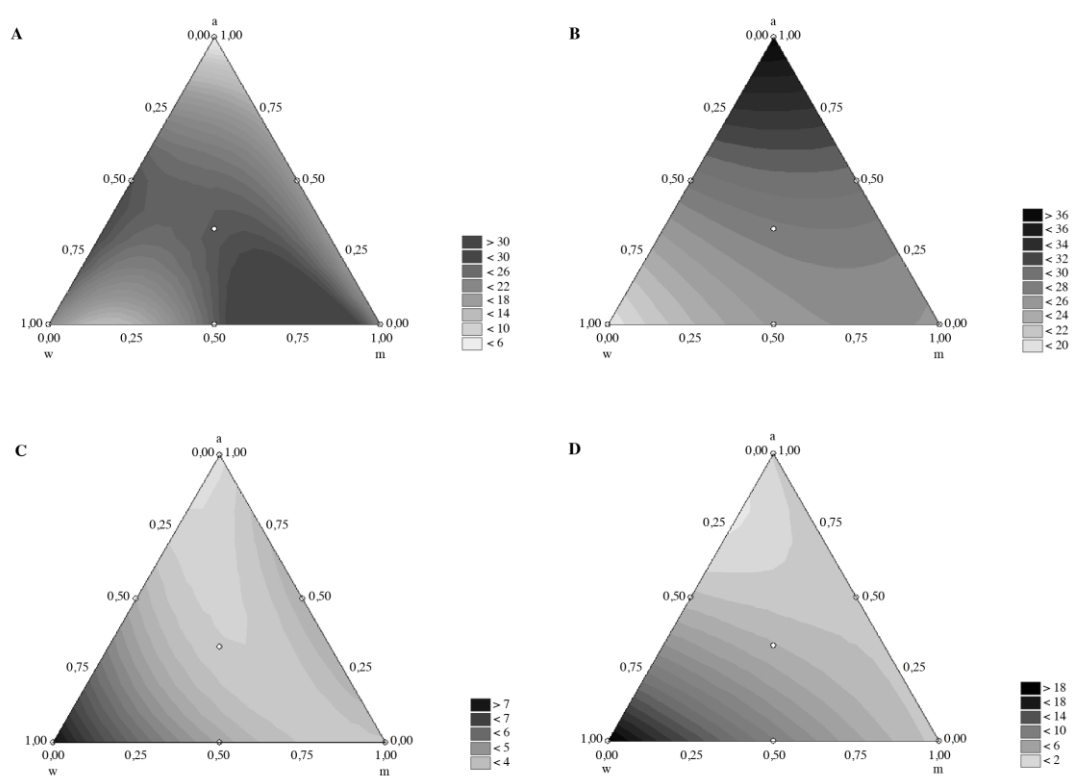


Figure 1. Response surface contour plot: (A) full cubic model of the dry residue; (B) quadratic model of the total polyphenol content; (C) and (D) special cubic model of the gallic catechin and epigallocatechin contents, respectively. All contour plots are in function of the water (w), methanol (m) and acetone (a) proportions with a constant 0% ethanol (e) composition.

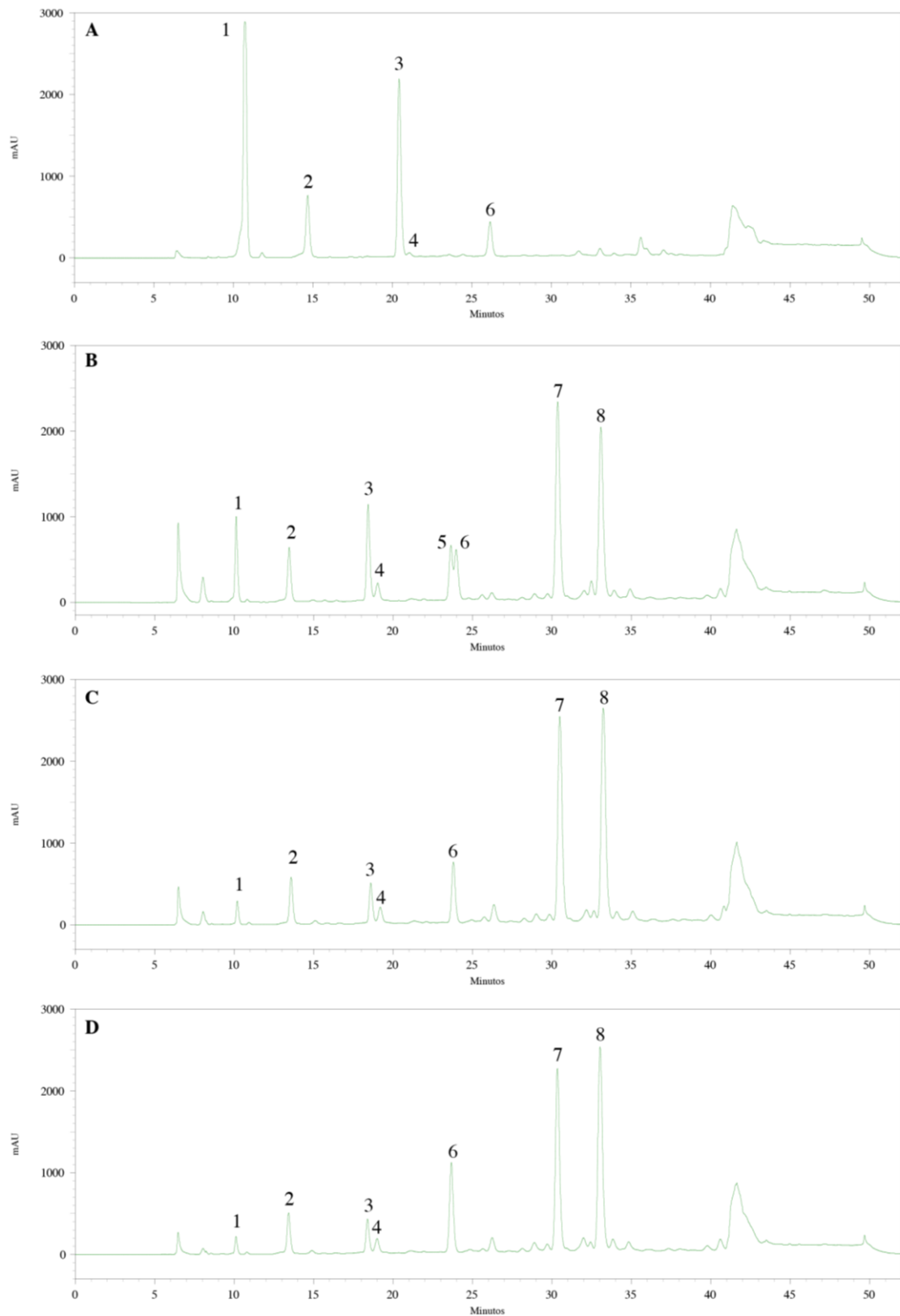


Figure 2. HPLC-DAD fingerprint of the ethyl-acetate fraction (FAE) from *L. brasiliense* rhizomes produced from pure water (A), water:methanol (1/2:1/2) (B), water:acetone:ethanol (1/3:1/3:1/3) (C) and methanol:acetone:ethanol (1/3:1/3:1/3) (D) for statistical mixtures design.

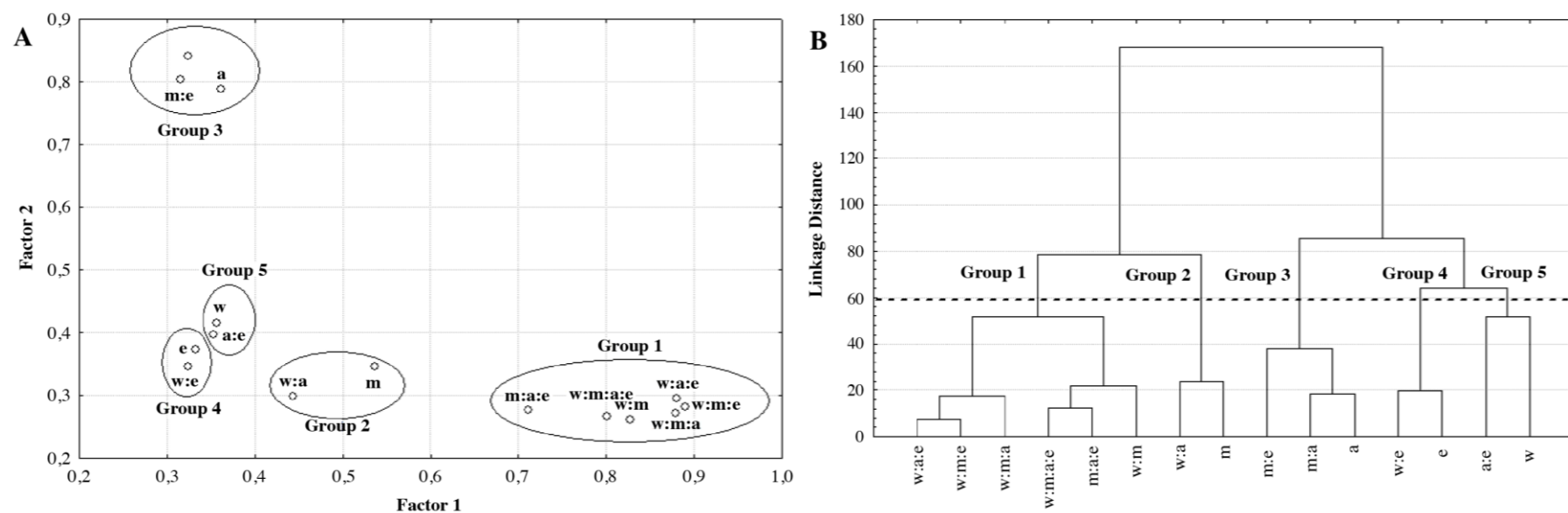


Figure 3. Plot of loading (A) from principal component 1 and 2 and hierarchical analysis dendrogram (B) of the chromatographic data of extracts from *L. brasiliense* produced in simplex centroid design

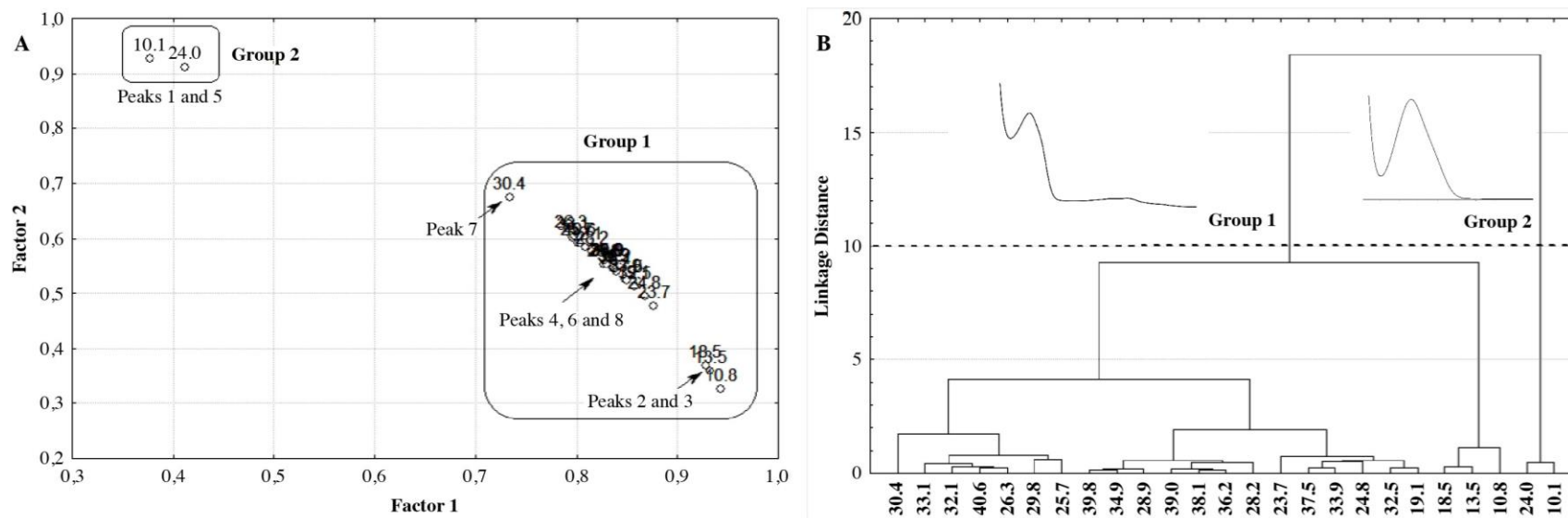


Figure 4. Plot of loading (A) from principal components 1 and 2 and hierarchical analysis dendrogram (B) of the UV spectra of the FAE sample of water:methanol (1/2:1/2, v/v) from *L. brasiliense* produced using the simplex centroid design.

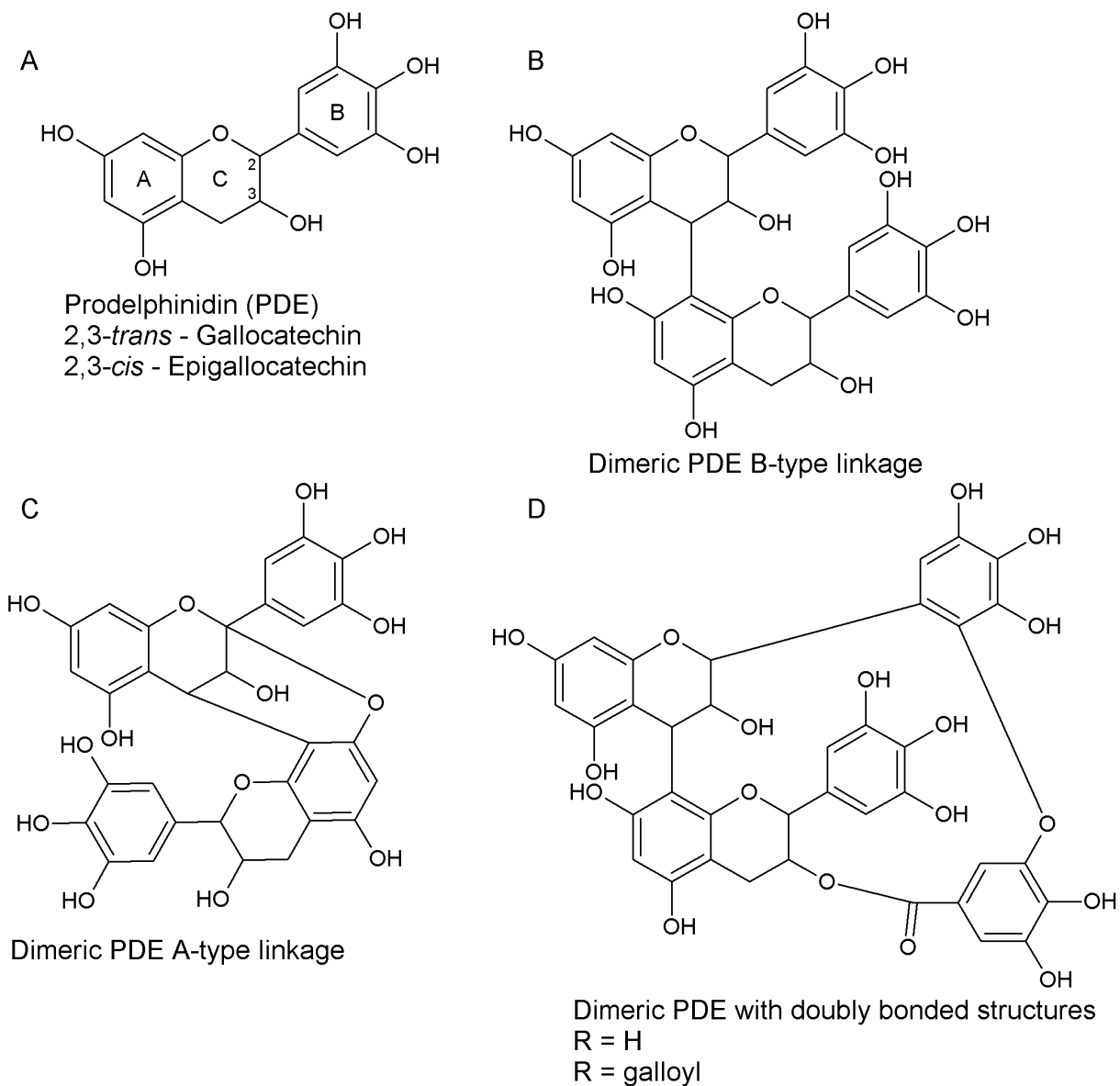


Figure 5. Some chemical structures identified from *L. brasiliense*. (A) the flavan-3-ol unit of the identified compounds; (B) and (C) condensed tannins possessing B- and A-type linkages; (D) B-type condensed tannins with double bonded linkage.

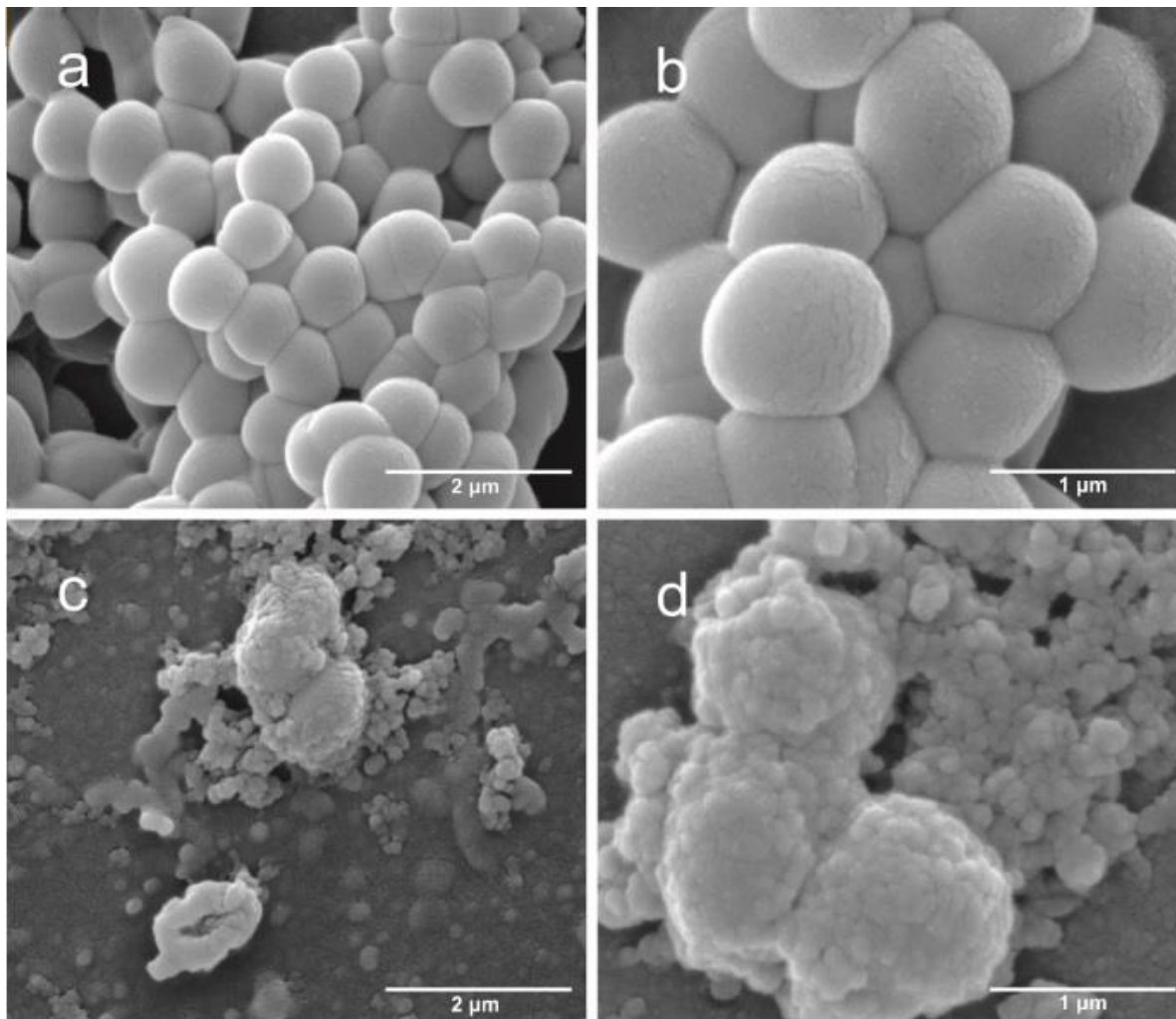


Figure 6. Scanning electron microscopy of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain N315 treated with FAE of methanol:acetone:ethanol (1/3:1/3:1/3) from *L. brasiliense* produced using the simplex centroid design (sample 14-FAE). (A) untreated MRSA N315 (control) at 40x; (B) untreated MRSA N315 (control) at 80x; (C) MRSA N315 treated with sample 14-FAE at 40,000 x; (D) MRSA N315 treated with sample 14-FAE at 80,000 x.

Table 1. Analytical results for dry residue, total polyphenol (TP), gallic catechin (GC) and epigallocatechin (EGC) content of extracts from *L. brasiliense* produced using the simplex centroid design.

Sample	Solvent proportions	Dry residue (%) ^b	TP (%) ^b	GC (%) ^b	EGC (%) ^b
1	w (1)	20.60 ± 0.79 [3.85]	18.94 ± 0.68 [3.57]	7.90 ± 0.39 [4.97]	19.61 ± 0.69 [3.53]
2	m (1)	22.37 ± 1.70 [7.60]	25.77 ± 0.24 [0.94]	3.70 ± 0.10 [2.79]	2.57 ± 0.06 [2.36]
3	a (1)	5.06 ± 0.40 [7.81]	37.46 ± 0.46 [1.24]	3.11 ± 0.18 [5.91]	2.10 ± 0.16 [7.68]
4	e (1)	17.15 ± 1.15 [6.71]	25.87 ± 0.46 [1.79]	4.14 ± 0.46 [11.14]	3.01 ± 0.53 [17.64]
5	w:m (1/2:1/2)	27.19 ± 0.78 [2.88]	25.16 ± 0.57 [2.28]	4.43 ± 0.17 [3.79]	9.13 ± 1.23 [13.51]
6	w:a (1/2:1/2)	28.23 ± 0.77 [2.73]	28.40 ± 0.57 [2.02]	4.31 ± 0.22 [5.20]	3.36 ± 0.16 [4.68]
7	w:e (1/2:1/2)	32.68 ± 3.69 [11.29]	25.84 ± 0.44 [1.70]	4.60 ± 0.10 [2.21]	4.18 ± 0.60 [14.34]
8	m:a (1/2:1/2)	18.06 ± 0.72 [3.97]	29.05 ± 0.52 [1.79]	4.25 ± 0.11 [2.69]	2.86 ± 0.07 [2.28]
9	m:e (1/2:1/2)	15.94 ± 0.84 [5.30]	26.89 ± 0.43 [1.60]	4.60 ± 0.17 [3.77]	2.99 ± 0.14 [4.59]
10	a:e (1/2:1/2)	14.66 ± 0.08 [0.52]	28.91 ± 1.30 [4.50]	3.74 ± 0.44 [11.83]	2.48 ± 0.28 [11.17]
11	w:m:a (1/3:1/3:1/3)	26.76 ± 1.06 [3.97]	28.21 ± 0.42 [1.50]	3.53 ± 0.20 [5.78]	2.82 ± 0.14 [4.83]
12	w:m:e (1/3:1/3:1/3)	25.10 ± 1.05 [4.20]	26.06 ± 0.33 [1.26]	3.72 ± 0.24 [6.58]	2.90 ± 0.12 [4.21]
13	w:a:e (1/3:1/3:1/3)	36.64 ± 0.97 [2.66]	28.10 ± 0.49 [1.73]	3.66 ± 0.21 [5.61]	2.90 ± 0.10 [3.60]
14	m:a:e (1/3:1/3:1/3)	19.87 ± 2.37 [11.90]	28.06 ± 0.68 [2.41]	3.79 ± 0.19 [4.92]	2.86 ± 0.12 [4.11]
15	w:m:a:e (1/4:1/4:1/4:1/4)	24.47 ± 0.23 [0.92]	27.91 ± 0.16 [0.59]	3.43 ± 0.12 [3.47]	2.70 ± 0.07 [2.43]
16	w:m:a:e (5/8:1/8:1/8:1/8)	30.43 ± 0.61 [2.00]	NA	NA	NA
17	w:m:a:e (1/8:5/8:1/8:1/8)	27.82 ± 0.17 [0.62]	NA	NA	NA
18	w:m:a:e (1/8:1/8:5/8:1/8)	23.52 ± 0.10 [0.42]	NA	NA	NA
19	w:m:a:e (1/8:1/8:1/8:5/8)	22.61 ± 0.08 [0.36]	NA	NA	NA
Confirmatory sample	w:a (3:7)	29.35 ± 1.07 [3.64]	29.25 ± 0.21 [0.73]	3.35 ± 0.10 [3.02]	3.70 ± 0.07 [2.64]

w = water; m = methanol; a = acetone; e = ethanol; NA = not applicable

^bMean ± standard deviation [residual standard deviation] of 3 replicates in 3 samples.

Table 2. Resistance profile of the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE_{fm}) and KPC-producing *K. pneumoniae* isolated from the Londrina University Hospital (Ruzon et al., 2010), methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from the Microbial Culture Collection of State University of Londrina (Kuroda et al., 2001)

Isolated strains	Source	Resistance profiles
VRE _{fm} 170	Infection	Ampicillin; Erythromycin; Teicoplanin; Vancomycin; Ciprofloxacin
MRSA N315		β -lactams; bleomycin; macrolide-lincosamide-streptogramin B; aminoglycosides (tobramycin, amikacin); spectinomycin
KPC 97	Infection	colistin; polymyxin; imipinem; meropenem; tigecycline; ceftazidime

Table 3. Identification of chromatographic peaks from ethyl-acetate fraction (FAE) of the extracts from *L. brasiliense* rhizomes produced from water:methanol (1/2:1/2, v/v) and UV, MS and MS/MS data on phenolic compounds.

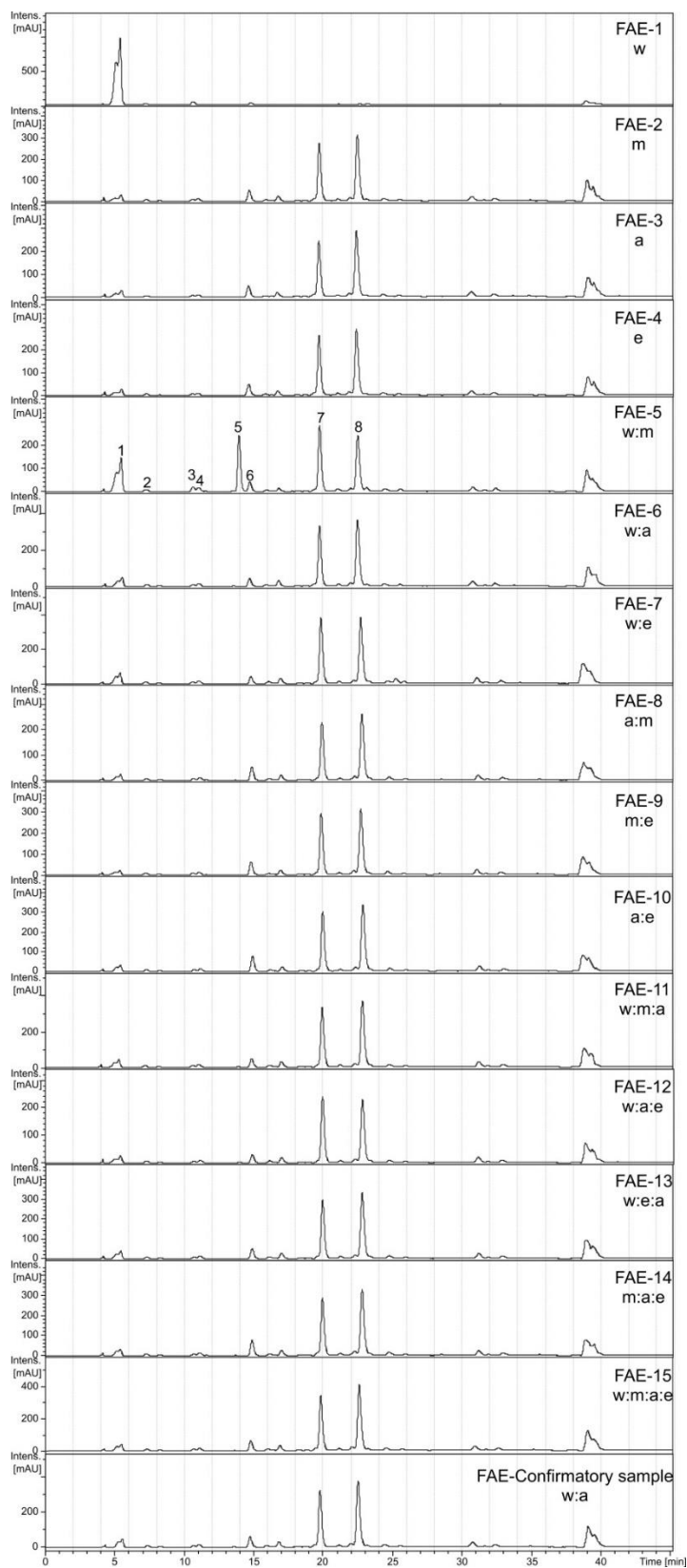
Peak	RT (min)	Compound	λ_{\max} (nm)	HR-ESI MS (m/z) [$M-H$] ⁻ (FM, error)	Negative Ion Mode (m/z) ^{IT}		Positive Ion (m/z) ^{IT}	
					MS [$M-H$] ⁻	MS/MS	MS [$M+H$] ⁺	MS/MS
1	5.2	Gallic acid st	274	169.0140 (C ₇ H ₅ O ₅ ⁻ , 1.6 ppm)	169	169→125	171	171→153, 127
2	8.1	Galocatechin st	275	305.0679 (C ₁₅ H ₁₃ O ₇ ⁻ , 4.1 ppm)	305	305→261, 219, 179, 125	307	307→289, 151, 139
3	11.5	Epigallocatechin st	275	305.0679 (C ₁₅ H ₁₃ O ₇ ⁻ , 4.1 ppm)	305	305→287, 261, 221, 179 179→151, 135	307	307→289, 139
4	12.4	PDE-PDE gallate (B-type)	273	761.1379 (C ₃₇ H ₂₉ O ₁₈ ⁻ , 2.5 ppm)	761	761→609, 423, 305 423→379, 230	763	763→745, 595, 459, 443, 425, 317, 305
5	14.9	Methyl gallate	273	183.0307 (C ₈ H ₇ O ₅ ⁻ , 4.6 ppm)	183	183→168, 124	185	185→153, 141
6	15.7	PDE-PDE gallate*	270	759.1206 (C ₃₇ H ₂₇ O ₁₈ ⁻ , 0.4 ppm)	759	759→607, 589, 481, 463, 423	761	761→743, 635, 455, 425
7	20.7	PDE gallate	273	457.0782 (C ₂₂ H ₁₇ O ₁₂ ⁻ , 1.3 ppm)	457	457→331, 305, 169 169→125	459	459→289, 139
8	23.1	PDE-PDE di-gallate*	272	911.1323 (C ₄₄ H ₃₁ O ₂₂ ⁻ , 1.1 ppm)	911	911→759, 741, 589, 571, 445, 423	913	913→895, 743, 617, 455, 437, 305 743→725, 617, 455, 305

RT: retention time; ^{IT}: ion trap analyzer data; st: confirmed by authentic standard; PDE: prodelphinidin; *A-type or B-type with double bonded structures.

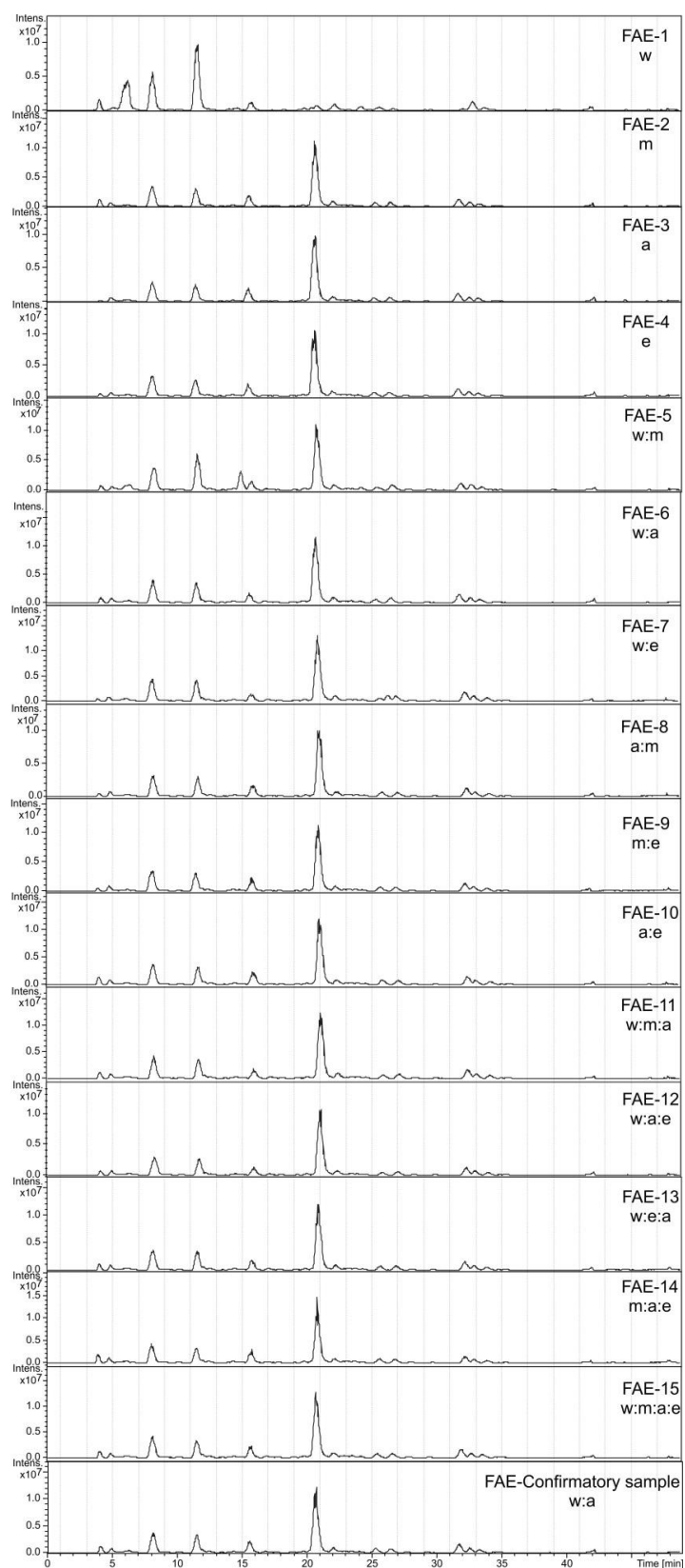
Table 4. Minimum inhibitory concentrations ($\mu\text{g/mL}$) of extracts from *Limonium brasiliense* produced using the simplex centroid design, as determined against standard and the multidrug-resistant bacterial strains *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*.

Sample	<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Enterococcus faecium</i>				<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
	CE		FAE		CE		FAE		CE		FAE	
	ATCC 29123	MRSA N315	ATCC 29123	MRSA N315	ATCC 6569	VRE _{fm} 170	ATCC 6569	VRE _{fm} 170	ATCC 10031	KPC 97	ATCC 10031	KPC 97
1	312.5	156.5	78	78	156.5	156.5	156.5	156.5	1,250	1,250	-	-
2	312.5	156.5	78	78	156.5	156.5	39	19	1,250	1,250	312.5	625
3	312.5	312.5	78	78	78	156.5	39	39	1,250	1,250	312.5	625
4	312.5	312.5	78	78	156.5	78	19	19	1,250	1,250	312.5	625
5	156.5	156.5	78	78	156.5	78	39	39	1,250	1,250	312.5	625
6	156.5	156.5	78	78	78	156.5	39	19	1,250	1,250	312.5	625
7	156.5	156.5	78	78	156.5	78	39	19	1,250	1,250	312.5	625
8	156.5	156.5	78	78	156.5	78	39	19	1,250	1,250	312.5	625
9	156.5	156.5	78	78	78	78	19	19	1,250	1,250	312.5	625
10	156.5	156.5	78	78	78	78	19	19	1,250	1,250	312.5	625
11	156.5	156.5	78	78	156.5	156.5	39	19	1,250	1,250	312.5	625
12	156.5	156.5	78	78	78	78	39	19	1,250	1,250	312.5	625
13	156.5	156.5	78	78	39	39	19	19	1,250	1,250	312.5	625
14	156.5	156.5	78	39	78	156.5	39	19	1,250	1,250	312.5	625
15	156.5	156.5	156.5	156.5	78	78	39	78	1,250	1,250	625	1250
Confirmatory sample	156.5	156.5	78	78	156.5	156.5	39	39	1,250	1,250	625	1250
Negative Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

No antibiotic activity (-); American type culture collection (ATCC); Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA); Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE_{fm}); *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC); Crude extract (CE); Ethyl acetate fraction (FAE)

SUPPORTING INFORMATION

Appendices A. Chromatograms at 270 nm of ethyl-acetate fractions (FAE) of the *L. brasiliense* extracts obtained using different solvents (solvents described in Table 1 of the manuscript).



Appendices B. Total ion chromatograms (negative ion mode) of ethyl-acetate fractions (FAE) of the *L. brasiliense* extracts obtained using different solvents (solvents described in Table 1 of the manuscript).

CAPITULO 3: Estudo fitoquímico de rizomas de *L. brasiliense*

Este capítulo consiste no relatório dos dados obtidos em relação ao estudo fitoquímico, referente ao isolamento de substâncias fenólicas obtidas dos rizomas de *L. brasiliense* e elucidação estrutural por técnicas de RMN e MS. Este trabalho será submetido à publicação em revista científica da área farmacêutica.

Chapter 3: Phytochemical study of rhizomes from *L. brasiliense*

*This chapter is the report of the data obtained in relation to the phytochemical study, which is the isolation of phenolic substances from *L. brasiliense* and structural elucidation by technique of NMR and MS. This work will be submitted to publication in scientific journal in the pharmaceutical area.*

Phytochemical study of rhizomes from *Limonium brasiliense*

Andressa Blainski,¹ Denise B. Silva², Norberto P. Lopes³, João C. P. Mello*¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, PR, Brazil

²Laboratórios de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LAPNEM), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS, Brazil

³Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Tel:+55 44 3011 4816. Fax: +55 44 3011 5050. E-Mail: mello@uem.br. Departamento de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, BR-87020-900, Maringá-PR, Brazil.

Abstract: *Limonium brasiliense* is from south Brazilian coast and used at the treatment of premenstrual syndrome, menstrual disturb, and genito-urinary infections. The aim of the present study was to isolate and elucidate the phenolic compounds present in its rhizomes by nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry, and circular dichroism. It was possible to identify monomeric prodelphinidins, as gallo catechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, and epigallocatechin 3-*O*-(2'→*O*→4'')-gallate, as well as dimeric prodelphinidins, as epigallocatechin gallate-(4β→8)-epigallocatechin gallate, epigallocatechin-3-*O*-(2'→*O*→3'')-gallate-(4β→8)-epigallocatechin-3-*O*-gallate and samarangenin B. It is the first time that was isolated these double bonded structures. Besides, it were identified derivates of myricetin, like as myricetin-3-*O*- α -L-rhamnoside and myricetin-3-*O*- β -D-galactoside-6''-gallate.

Keywords: Baicuru, *Limonium brasiliense*, samarangenin B, condensed tannins, NMR spectroscopy, Mass spectrometry

INTRODUCTION

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) is a perennial herb that grows in Argentina, Uruguay, and the southern coast of Brazil. It is commonly known as “baicuru” or “guaicuru”. Preparations of its dried rhizomes have been used in the treatment of premenstrual syndrome and menstrual disorder, and as an antiseptic in genito-urinary infections. Studies report

bacteriostatic, antiinflammatory and antioxidant effects and the presence of hydrolyzable and condensed tannins, leucoanthocyanins, flavonoids, β -sitosterol, saponins, and coumarin in rhizome of *L. brasiliense* (Antonelli-Ushirobira et al., 2015a-b; Cardoso, 1990; Moura, 1984; Murray et al., 2004; Rosito-Filho, 1975).

Tannins seem to be a featured chemical class from *L. brasiliense*, however they are complex structures and the analytical data depends on several factors as preparation of sample, its storage and appropriated technical of extraction (Mueller-Harvey, 2001; Schofield et al., 2001). The aim of this study was to isolate and elucidate phenolic compounds of a semipurified fraction of rhizomes from *L. brasiliense*.

EXPERIMENTAL SECTION

Plant material

Rhizomes of *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) were collected in February 2013 in Rio Grande, in the state of Rio Grande do Sul, Brazil (S 31° 59' 33"/W 52° 10' 43"). Voucher specimen was deposited at the Herbarium of the State University of Maringá under number HUEM-27725. The plant material was collected under a permit from IBAMA-SISBIO, No. 11995-3, November 2, 2010, authentication code 46367613, under the responsibility of J. C. P. Mello. Access to the botanical material was authorized and licensed by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), registered under No. 010252/2015-0. The plant materials were cleaned with water to remove soil, dried in a circulating-air oven (37 ± 2 °C), and powdered in a hammer mill (Tigre ASN-5).

Extract preparation and isolation of compounds

The crude extract (CE) was prepared from the dried rhizomes (5.0 kg) using an acetone:water solution (7:3, v/v, 10% w/v) in an Ultra-Turrax (UTC115KT, Wilmington, NC, USA; 3000 rpm, 4 times x 5 min, $t < 40$ °C). Next, the extract was filtered, the organic phase was removed in a rotavapor (Büchi R-135), and the residue was lyophilized (Christ Alpha 1–4) to yield the CE (27.6%). The CE was solubilized in water in the proportion of 10% (w/v) and partitioned with ethyl acetate (10 times the volume of water). The ethyl-acetate (FAE – 10.4%) and aqueous (FAQ – 72.4%) fractions were concentrated and lyophilized as previously described to yield. The FAE (20.0 g) was separated in a chromatographic column (CC) on Sephadex LH-20 (600 x 50 mm) with the following eluents: 40% ethanol (1.0 L), 60% ethanol (8.1 L), 80% ethanol (1.0 L), ethanol (2.0 L), methanol (1.6 L) and 70% acetone (3.7 L). It was collected 10 mL/tube (1 mL/min) and yielded 16 main fractions. Each main fraction was further separated by high speed countercurrent chromatography (HSCCC), which was carried out with solvent system ethyl acetate:*n*-propanol:water (140:8:80), flow rate 0.8-1.1 mL/min, using the upper phase as mobile phase; 800 rpm. The CC and HSCCC were monitored by thin-layer chromatography (TLC); the eluates were applied in aluminium sheet (TLC Silica gel 60 F254, 20 x 20

cm, Merck), using the solvent system ethyl acetate:formic acid anhydrous:water (90:5:5, v/v) for 4 cm. After drying, the TLC was sprayed with ferric chloride, hexahydrat, 1% in methanol (w/v). The chosen subfractions for elucidation analysis were submitted to acetylation procedures: sample (ca. 10 mg) in glass flask protected of light with aluminium-fovia, adding acetic anhydride (1 mL) and pyridine (1 mL); the reaction happened for 24 h and it was stopped in ice bath, as well as crushed ice into the flask, for 2 h; after the solution was filtered in sintered glass funnel and washed with cool water; the precipitate was solubilized with acetone, that was removed in a rotavapor; acetone was added and removed several times until whitening the subfraction. Some acetylated subfractions were further separated by preparative-TLC; for this the subfractions were solubilized in acetone (1 mL) and applied in preparative TLC (Silica gel 60 F254, 20 x 20 cm, Merck) and the solvent system was toluene:water (7:3 or 6:4). After drying, each band was removed to sintered glass funnel and the compound was recovered using acetone. The fractions and subfractions were dried by rotavapor and lyophilized.

Elucidation analysis

The isolated compounds were analysed by nuclear magnetic resonance (NMR) 1D (^1H e ^{13}C), RMN 2D (COSY, HSQC e HMBC) in equipment Bruker, Model AVANCE III HD, of 500 MHz to ^1H and 125 MHz to ^{13}C , using the deuterated solvents (chloroform – CDCl_3 ; acetone – $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$).

The optical determination ($[\alpha]_D^{20^\circ}$) by polarimetry of acetylated compounds were carried out using acetone and methanol at 20 °C and cuvette of 0.1 dm at 589 nm, in equipment PerkinElmer® (Model 343). The following equation determine the value:

$$[\alpha]_D^{20^\circ} = \frac{100.\alpha}{l.c}$$

Where: α = optical rotation in grad at 20 ± 0.5 °C

l = length of cuvette in dm

c = concentration of compound in percentage (m/v)

The circular dichroism (CD) analysis of acetylated compounds were carried out using methanol (HPLC grade) at 20 °C and cuvette of 5 mm and measured at 200-400 nm, in equipment Jasco (Model J-815).

The LC-DAD-MS analyses were carried out on a Shimadzu Prominence UFLC coupled to a diode array detector (SPD-M20A, Shimadzu) and mass spectrometer (AmaZon SL and MicroTOF-Q III - Bruker Daltonics, Billerica, USA) with electrospray ionization (ESI). The analyses followed the chromatographic conditions: flow rate of 0.8 mL/min; mobile phase constituted by water (A) and acetonitrile (B), both with formic acid (0.1%, v/v), applying the elution gradient: 0 min 10% B, 15 min 15% B, 35 min 19% B, 36 min 80% B, 44 min 80% B, 45 min 10% B, 52 min 10% B; oven temperature: 30 °C; column: Agilent Zorbax C-18 (250 mm x 4.6 mm) 5 μm . The FAE samples were

prepared in water:methanol (8:2, v/v) at a concentration of 1 mg/mL, filtered on a 0.22 μm x 3.0 mm (Millex[®], Millipore) PTFE membrane and injected at a volume of 20 μL . Electrospray ionization source was used in positive and negative ion modes over a mass range of m/z 100–1200 and 1000–2000 using the following instrument settings: nebulizer gas nitrogen of 725 bar; dry gas nitrogen of 9 L/min at temperature 300 °C; capillary voltage of 3.0 kV; the end plate offset of 500 V and the MS/MS analyses were carried out in automatic mode. Helium gas was used as a collision gas. The total ion chromatograms (TIC) were recorded by alternating automatic events in the ion trap analyzer. We analysed all subfractions, which were identified by NMR.

RESULTS AND DISCUSSION

The gallo catechin was obtained in subfractions F#12#3 and F#13#7 (102.7 mg) and represents 0.5% of the FAE. The analyses by LC-DAD-MS and MSⁿ showed the peak at 4.2 min for subfraction F#12#3 and deprotonated ions at m/z 305.0673 [M-H]⁻ compatible with C₁₅H₁₃O₇⁻ (error: 2.0 ppm) (Erşan et al., 2016; Guaratini et al., 2014). The paracetylated substance showed $[\alpha]_D^{20}$: +12.1 (acetone, c 3.05), $[\alpha]_D^{20}$: +21.3 (methanol, c 0.6) and, the CD spectrum (Figure 1) showed a positive band at 240 nm and negative band at 280 nm characteristic to 2R, 3S configuration (Korver and Wilkins, 1971; Mello et al. 1996). The paracetylated substance was analysed by NMR (Table 1 and Figure 2). The ¹H signals of H-2(C) and H-3(C) showed coupling constant (J) of 6.4 Hz, according to the *trans*-configuration. The three substitution of the B-ring are verified by the characteristic singlet with two protons at δ 7.11 ppm corresponding to H-2' and H-6'. The position of the protons was confirmed by 2D-NMR correlation with the H-2 (¹H/¹H-COSY). The number of protons was confirmed by integral of 0.0447 (1H = 0.022). The correlations COSY and HMBC confirmed the position of each hydrogen and carbon. All data are compatible to the data previously published (Mello et al., 1996).

Figure 1. CD-Spectrum of the paracetylated gallo catechin (methanol, c 152.5 $\mu\text{g/ml}$).

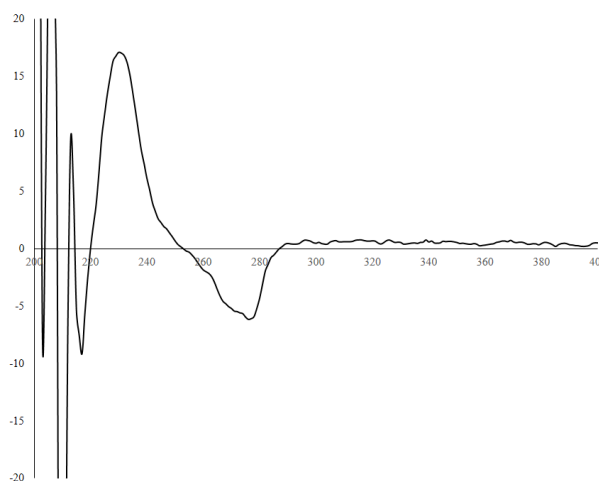
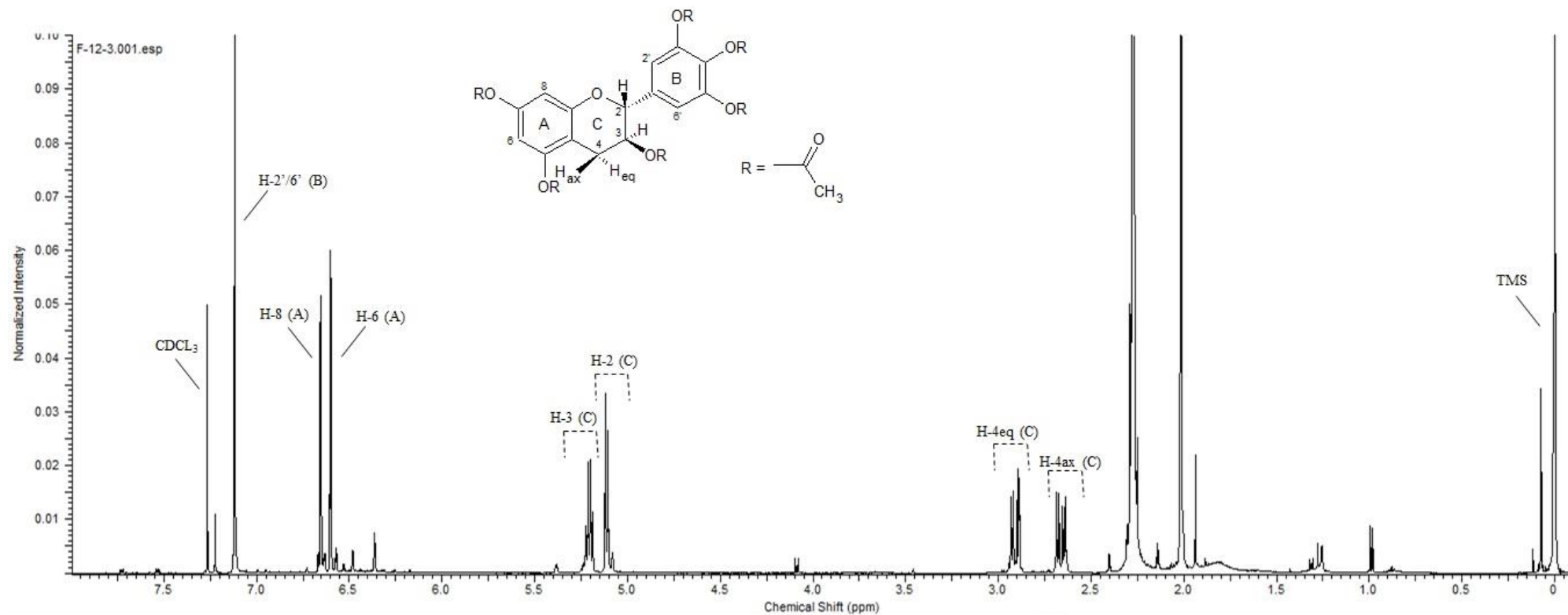


Table 1. NMR-Data of paracetylated gallo catechin (500 MHz/¹H, 125 MHz/¹³C, CDCl₃, relative to TMS)

H/C	¹ H δ (ppm)	Multiplicity/ <i>J</i> (Hz)	Integrals	¹³ C δ (ppm)	HMBC
O-Ac (group.)	2.02 – 2.29	6 x s		20.2-21.1 166.8-170.2	68.3 (C-3) 134.4 (C-4') 143.5 (C-3'/5') 149.5 (C-5) 149.8 (C-7)
4 _{ax} (C)	2.66	dd ² J _{H-4ax – H-4eq} = 16.8 ³ J _{H-4ax – H-3} = 6.7	0.0281	24.1	68.3 (C-3) 77.4 (C-2) 110.2 (C-10) 149.4 (C-5) 154.2 (C-9)
4 _{eq} (C)	2.91	dd ² J _{H-4eq – H-4ax} = 16.8 ³ J _{H-4eq – H-3} = 5.2	0.0251		
2 (C)	5.12	d ³ J _{H-2 – H-3} = 6.4	0.0253	77.4	24.1 (C-4) 68.3 (C-3) 118.9 (C-2'/6') 135.8
3 (C)	5.23	ddd ³ J _{H-3 – H-2} = 6.4 ³ J _{H-3 – H-4ax} = 6.7 ³ J _{H-3 – H-4eq} = 5.2	0.0255	68.3	24.1 (C-4) 77.4 (C-2) 110.2 (C-10) 135.8 (C-1')
6 (A)	6.60	d ⁴ J _{H-6 – H-8} = 2.1	0.0213	108.9	107.7 (C-8) 110.2 (C-10) 149.5 (C-5) 149.9 (C-7)
8 (A)	6.66	d ⁴ J _{H-8 – H-6} = 2.1	0.0220	107.7	108.9 (C-6) 110.2 (C-10) 149.9 (C-7) 154.2 (C-9)
2'/6' (B)	7.11	S	0.0447	118.9	77.4 (C-2) 118.9 (C-2'/6') 134.6 (C-4') 135.8 (C-1') 143.5 (C-3'/5')

δ = displacement; *J* = coupling constant; s = singlet; d = doublet; dd = doublet of doublets; ddd = doublet of doublet of doublets

Figure 2. $^1\text{H-NMR}$ -Spectrum of the peracetylated gallocatechin (500 MHz, CDCl_3 , relative to TMS).



The subfractions F#13#8#P2 (14.8 mg) is related to epigallocatechin and represents 0.3% of the FAE. By The LC-DAD-MS and MSⁿ analyses showed the peak at 8.4 min for subfraction F#13#8 and deprotonated ions at m/z 305.0670 [M-H]⁻ compatible with C₁₅H₁₃O₇⁻ (error: 1.2 ppm) (Erşan et al., 2016; Guaratini et al., 2014). The paracetylated substance showed $[\alpha]_D^{20}$: -15.5 (acetone, c 1.48) and the CD spectrum (Figura 3) showed a positive band at 240 nm and negative band at 280 nm correspondent to a 2R, 3S configuration (Korver and Wilkins, 1971; Mello et al., 1996). The paracetylated substance was analysed by NMR (Table 2 and Figure 4) and the H-2(C) and H-3(C) presents coupling constant < 1.0 Hz, according to the *cis*-configuration. The three substitution of the B-ring are verified by the characteristic singlet with two protons at δ 6.57 ppm corresponding to H-2' and H-6'. It was waited at circa δ 7.2 ppm as showed in literature (Mello et al., 1996) and previously for gallocatechin, however the B-ring is freely rotating and is more influenced by solvents change and, for this analysis was carried with deuterated acetone instead of chloroform. The correlation with the H-2 (¹H/¹H-COSY) confirmed that signal at δ 6.57 ppm corresponds to H-2' and H-6' and, the number of protons was confirmed by integral of 0.0143 (1H = 0.0070). The correlations COSY and HMBC confirmed the position of each hydrogen and carbon.

Figure 3. CD-Spectrum of the paracetylated epigallocatechin (methanol, c 37.0 μ g/ml).

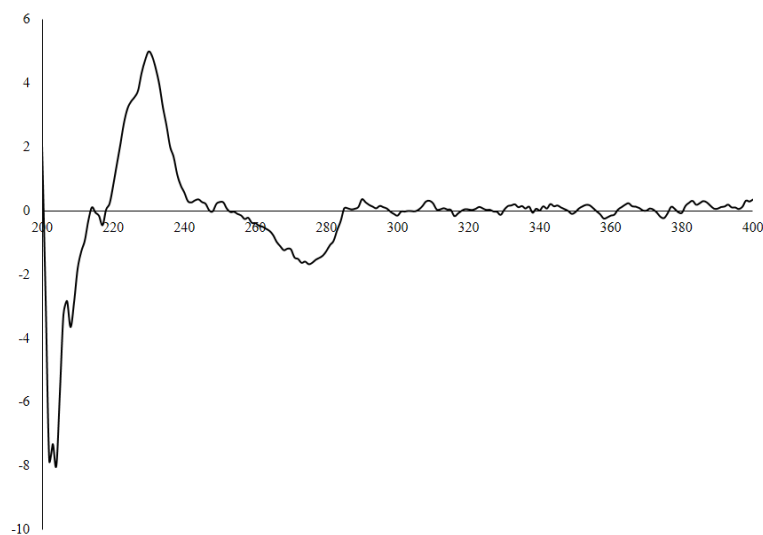
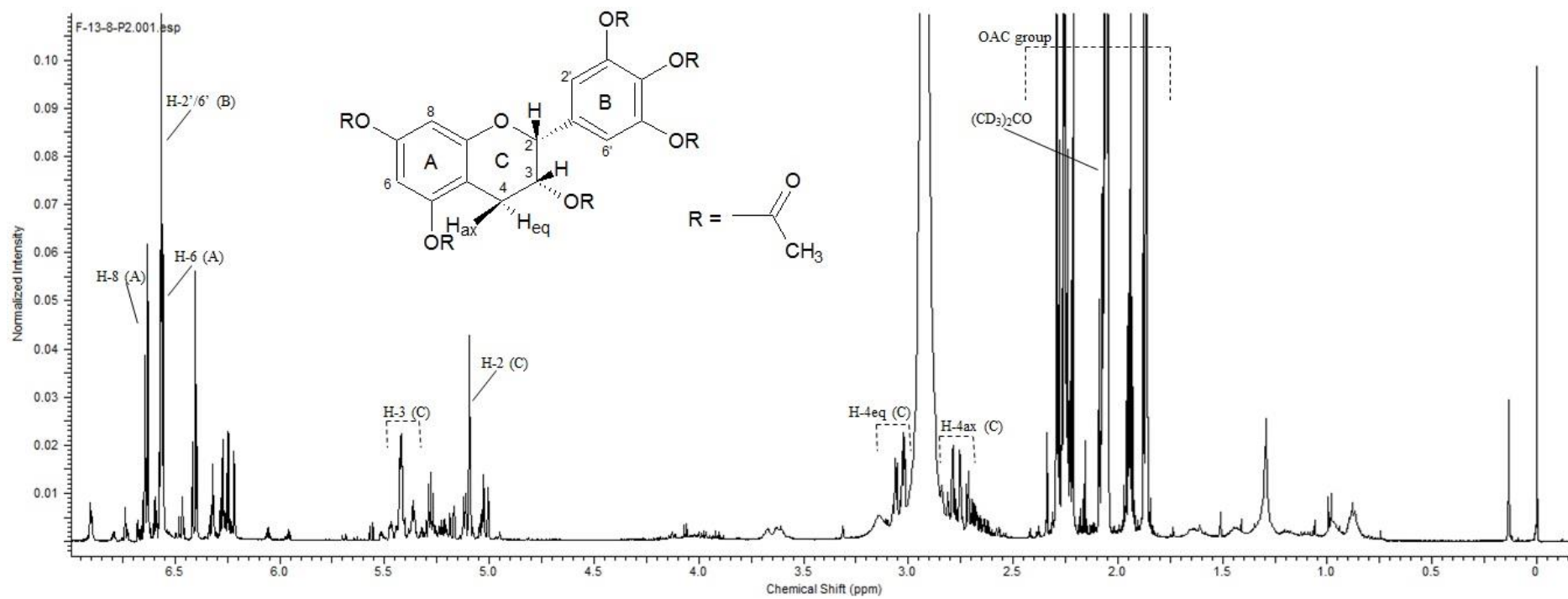


Table 2. NMR-Data of peracetylated epigallocatechin (500 MHz/¹H, 125 MHz/¹³C, (CD₃)₂CO, relative to TMS)

H/C	¹ H- δ (ppm)	Multiplicity J (Hz)	Integrals	¹³ C- δ (ppm)	HMBC
O-Ac group	1.86 – 2.29	m			
4ax (C)	2.75-2.79	dd ³ J _{H-4ax-H-3} = 2.0 ² J _{H-4ax-H-4eq} = 17.1	0.0083	26.9	67.9 (C-3) 78.4 (C-2) 111.3 (C-10)
4eq (C)	3.02-3.04	dd ³ J _{H-4eq-H-3} = 4.5 ² J _{H-4eq-H-4ax} = 17.1	0.0103		151.2 (C-5) 156.6 (C-9)
2 (C)	5.09	br s	0.0066	78.4	26.9 (C-4) 67.9 (C-3) 106.8 (C-2'/6') 129.8 (C-1')
3 (C)	5.41-5.43	ddd ³ J _{H-3-H-2} < 1.0 ³ J _{H-3-H-4ax} = 2.0 ³ J _{H-3-H-4eq} = 4.5	0.0077	67.9	111.3 (C-10)
6 (A)	6.56	d ⁴ J _{H-6-H-8} = 2.4	0.0080	107.0	108.6 (C-8) 111.3 (C-10) 151.2 (C-5)
2'/6' (B)	6.57		0.0143	106.8	78.4 (C-2) 106.8 (C-2'/6') 129.8 (C-1') 133.6 (C-4') 146.4 (C-3'/5')
8 (A)	6.63	d ⁴ J _{H-8-H-6} = 2.4	0.0067	108.6	107.0 (C-6) 111.3 (C-10) 150.9 (C-7) 156.6 (C-9)

δ = displacement; J = coupling constant; s = singlet; br s = broad singlet; d = doublet; dd = doublet of doublets; ddd = doublet of doublet of doublets

Figure 4. $^1\text{H-NMR}$ -Spectrum of the peracetylated epigallocatechin (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, relative to TMS).



The epigallocatechin gallate was obtained in subfractions F#16#2, F#16#3, and F#16#4 (132.5 mg) and represents 0.7% of the FAE. The analyses by LC-DAD-MS and MSⁿ showed the peak at 12.9 min for subfraction F#16#2 and deprotonated ions at m/z 457.0757 [M-H]⁻ compatible with C₂₂H₁₇O₁₁⁻ (error: 1.3 ppm); the presence of galloyl unit was confirmed by the losses of 152 *u* (galloyl) (Erşan et al., 2016; Guaratini et al., 2014). The paracetylated substance showed $[\alpha]_D^{20}$: -70.4 (acetone, c 3.92), $[\alpha]_D^{20}$: -70.2 (methanol, c 0.8) and, the CD spectrum (Figura 5) showed negative bands at 240 nm and 280 nm in discordance with waited spectrum as epigallocatechin (2R, 3S configuration). This result showed the influence of substituent at C-3 on the CD-spectrum (Mello et al., 1996). The paracetylated substance was analysed by NMR. The ¹H spectrum and NMR data (Figure 6 and Table 3) shows the absence of the aliphatic acyl signal at circa δ 2.0 and the H-3 at 5.62-5.65 in agreeing with previously published data of epigallocatechin-3-*O*-gallate (H-3: δ 5.60-5.67, Mello, 1995) for a proton in downfield shift. Besides, there is an additional signal at δ 7.62 ppm characteristic of a singlet of two protons (Integral = 0.0196; 1H = 0.010) from H-2" and H-6" of a galloyl unit. The coupling constant for $J_{2,3} \leq 1.0$ is related to the *cis*-configuration, that confirm the flavan-3-ol unit of epigallocatechin. The three substitutes of the B-ring are verified by the characteristic singlet with two protons at δ 7.23 ppm (integral = 0.0199) of H-2' and H-6', and the position was confirmed by correlation with the H-2 (¹H/¹H-COSY). The COSY and HMBC correlations confirmed the position of each proton and carbon. The data are compatible to the data previously published (Mello et al., 1996).

Figure 5. CD-Spectrum of the paracetylated epigallocatechin gallate (methanol, c 9.9 μ g/ml).

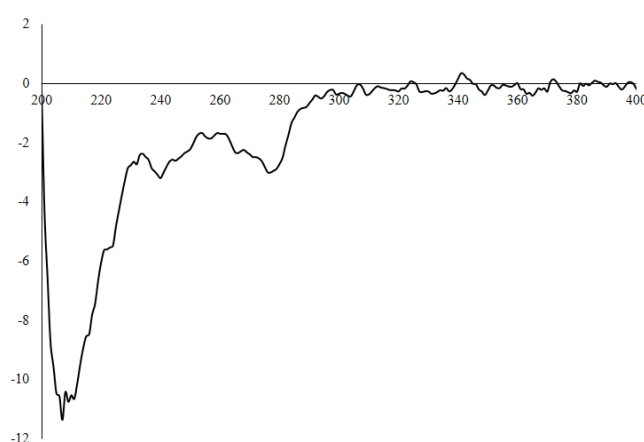
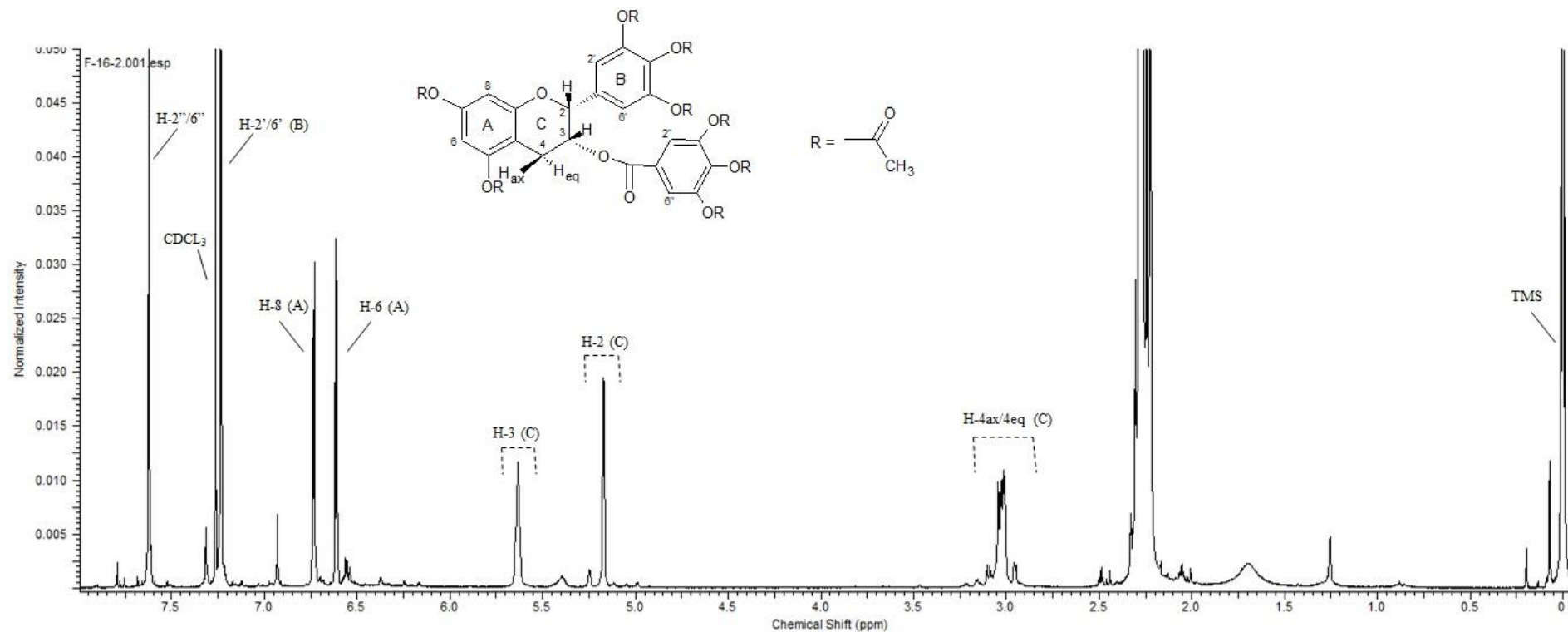


Table 3. NMR-Data of the paracetylated epigallocatechin gallate (500 MHz/¹H, 125 MHz/¹³C, CDCl₃, relative to TMS).

H/C	¹ H δ (ppm)	Multiplicity/J (Hz)	Integrals	¹³ C δ (ppm)	HMBC
O-Ac (group)	2.23 – 2.33	8 x s		20.2-21.1 166.2-168.9	134.4 (C-4') 139.0 (C-4'') 143.4 (C-3''/5'') 143.5 (C-3'/5') 149.7/149.8 (C-5/C-7)
4 _{ax} (C)	2.97-3.01	dd ² J _{H-4ax-H-4eq} = 18.0 ³ J _{H-4ax-H-3} = 2.4	0.0114	25.9	68.0 (C-3) 76.6 (C-2) 109.5 (C-10) 149.7 (C-5) 154.8 (C-9)
4 _{eq} (C)	3.04-3.08	dd ² J _{H-4eq-H-4ax} = 18.0 ³ J _{H-4eq-H-3} = 4.4	0.0125		
2 (C)	5.17	br s	0.0103	76.6	24.9 (C-4) 68.0 (C-3) 118.8 (C-2'/6') 135.1 (C-1')
3 (C)	5.62-5.65	M	0.0107	68.0	109.1 (C-6) 163.6 (C-7'')
6 (A)	6.61	d ⁴ J _{H-6-H-8} = 2.4	0.0095	109.1	108.1 (C-8) 149.7/149.8 (C-5/C-7)
8 (A)	6.74	d ⁴ J _{H-8-H-6} = 2.4	0.0102	108.1	109.1 (C-6) 154.8 (C-9) 149.7/149.8 (C-5/C-7)
2'/6' (B)	7.23	S	0.0199	118.9	76.6 (C-2) 118.8 (C-2'/6') 134.4/135.1 (C-4'/C-1') 143.5 (C-3'/5')
2''/6''	7.62	S	0.0196	122.4	122.4 (C-2''/6'') 127.5 (C-1'') 139.0 (C-4'') 143.4 (C-3''/5'') 163.6 (C-7'')

δ = displacement; *J* = coupling constant; br s = broad singlet; s = singlet; d = double; dd = doublet of doublets; m = multiplet

Figure 6. $^1\text{H-NMR}$ -Spectrum of the peracetylated epigallocatechin gallate (500 MHz, CDCl_3 , relative to TMS).



The epigallocatechin-3-*O*-(2'→*O*→4'')-gallate was obtained in subfraction F#20#5 (132.5 mg) and represents 0.09% of the FAE. The paracetylated substance showed $[\alpha]_D^{20}$: -29.2 (acetone, c 4.52); $[\alpha]_D^{20}$: -42.0 (methanol, c 0.9) and, the CD spectrum (Figure 7) showed negative bands at 240 nm and 280 nm, similar to epigallocatechin gallate, which suggest the similar configuration for this substance. The peracetylated substance was analysed by NMR. The ^1H spectrum and NMR data (Figure 8 and Table 4) confirmed the presence of a flavan-3-ol unit with the *cis*-configuration ($J_{2,3} \leq 1.0$). The H-3 (δ 5.68 ppm) is in according with showed for epigallocatechin-3-*O*-gallate (Table 3) for a proton in downfield shift. because a galloyl substituent. Besides, the HMBC showed the correlation between H-3 and the carbon of carbonyl (δ 163.5 ppm) and confirmed the position 3-*O* for galloyl unit. The two protons singlet (δ 7.64 ppm; integral = 0.0161) showed correlation with carbonyl (δ 163.5 ppm) and confirmed the presence of galloyl unit. The H-2 (δ 4.79 ppm) has a correlation (1H/1H-COSY) with one proton singlet at δ 7.62 ppm (integral = 0.0089), what proposed a substitution at C-2' of B-ring. This new linkage is in the galloyl unit at C-4''. The analysis of acetyl groups corroborates for this propose and showed the presence of 7 groups instead of 8 as in epigallocatechin-3-*O*-gallate. Besides, the HMBC-spectrum confirmed the absence of the correlation of any acetyl with C-4''. The presence of unchanged singlet of two protons for H-2'' and H-6'' discard the possibility of the linkage at C-3'' or C-5''. To the best knowledge, the natural occurrence of this compound is described here for the first time.

Figure 5. CD-Spectrum of the peracetylated epigallocatechin-3-*O*-(2'→*O*→4'')-gallate (methanol, c 11.3 $\mu\text{g/ml}$).

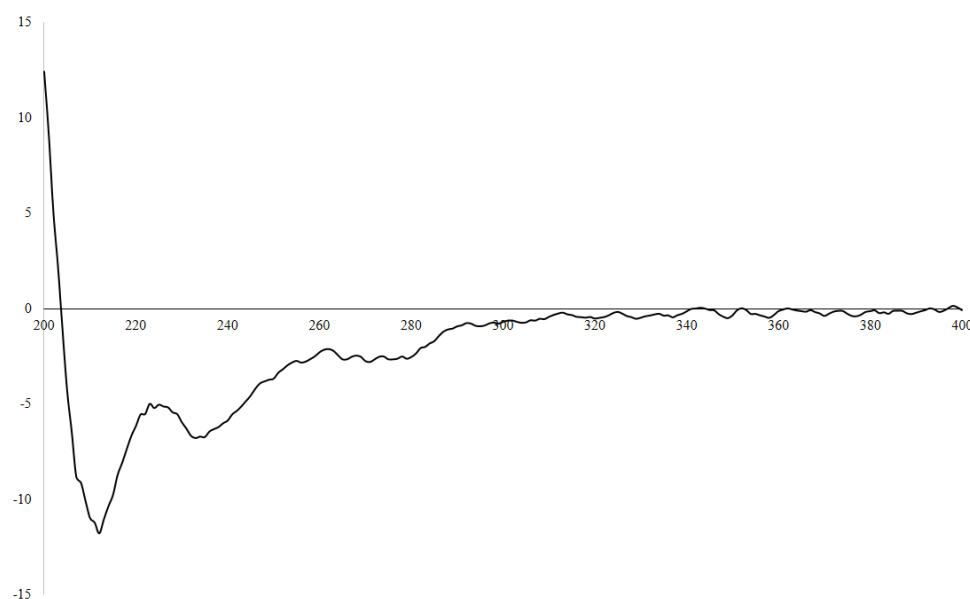
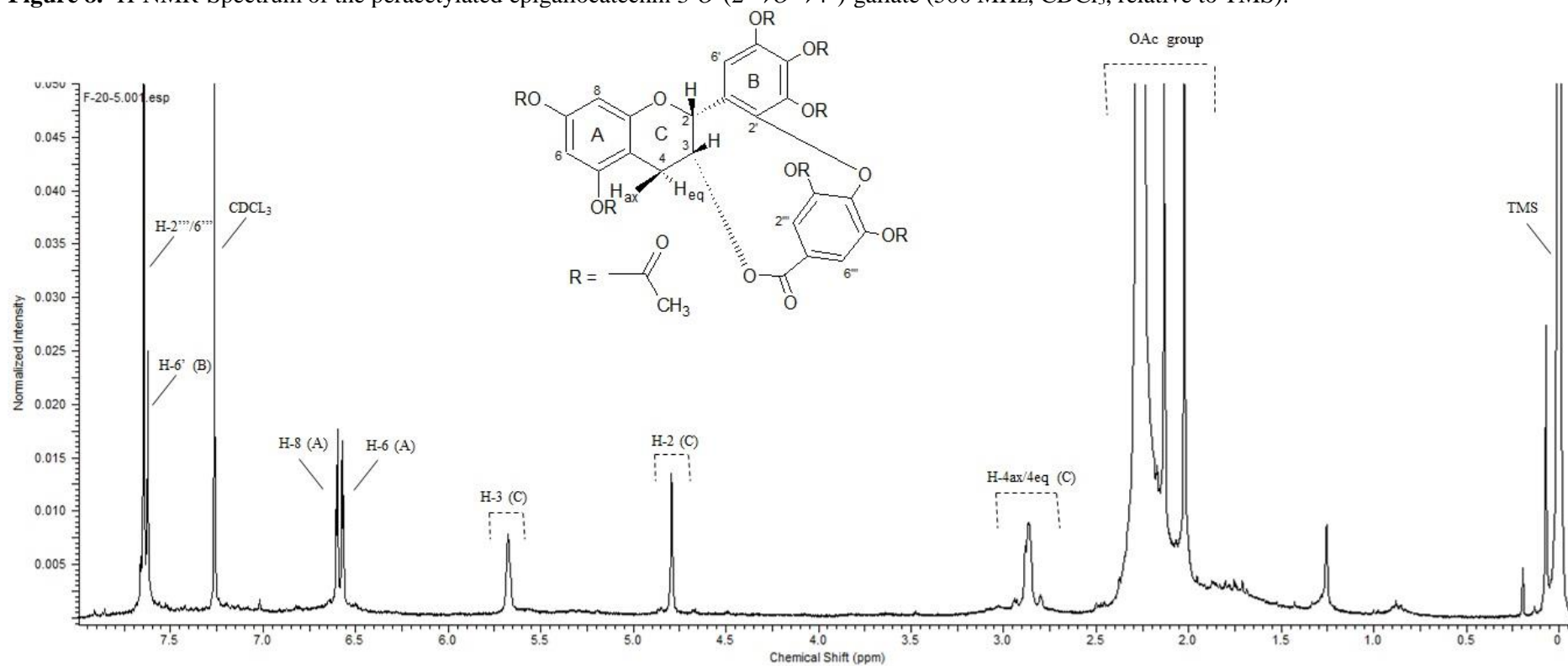


Table 4. NMR-Data of the paracetylated epigallocatechin-3-*O*-(2'→*O*→4'')-gallate (500 MHz/¹H, 125 MHz/¹³C, CDCl₃, relative to TMS).

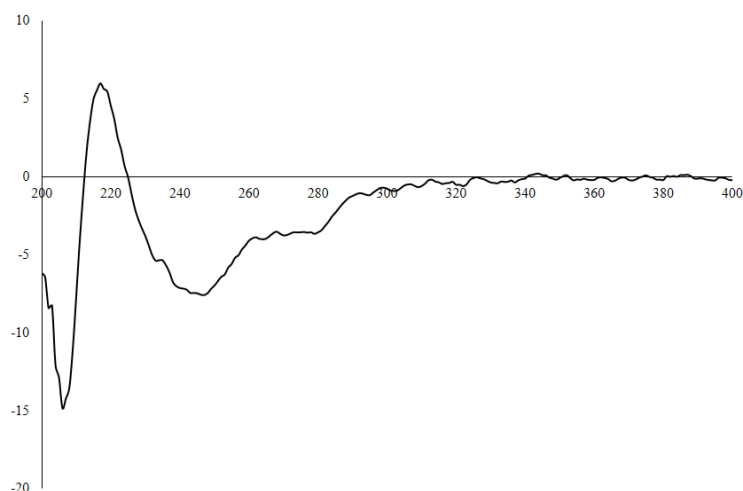
H/C	¹ H δ (ppm)	Multiplicity/J (Hz)	Integrals	¹³ C δ (ppm)	HMBC
O-Ac group	2.02 – 2.28	m		19.9-21.1 166.2-168.9	135.6 (C-4') 143.3 (C-3''/5'') 142.1 (C-5') 144.0 (C-3') 149.4/149.5 (C-5/C-7)
4 _{ax} /4 _{eq} (C)	2.86	br s	0.0165	26*	100.0 (C-6)
2 (C)	4.79	br s	0.0080	74.2	66.6 (C-3) 121.1 (C-6') 123.0 (C-2') 134.4 (C-1')
3 (C)	5.68	m	0.0092	66.6	109.0 (C-6) 163.5 (C-7'')
6 (A)	6.57	d ⁴ J _{H-6-H-8} = 2.2	0.0092	109.0	108.0 (C-10) 109.5 (C-8) 149.4/149.5 (C-5/C-7) 155.1 (C-9)
8 (A)	6.60	d ⁴ J _{H-8-H-6} = 2.2	0.0092	109.5	109.00 (C-6) 149.4/149.5 (C-5/C-7) 155.1 (C-9)
6' (B)	7.62	s	0.0089	121.1	74.2 (C-2) 123.0 (C-2') 134.4 (C-1') 135.6 (C-4') 142.1 (C-5') 144.0 (C-3')
2''/6''	7.64	s	0.0161	122.4	122.4 (C-2''/6'') 127.8 (C-1'') 140* (C-4'') 143.3 (C-3''/5'') 163.5 (C-7'')

δ = displacement; J = coupling constant; brs = broad singlet; s = singlet; d = double; m = multiplet; *not visible in ¹³C spectrum.

Figure 8. $^1\text{H-NMR}$ -Spectrum of the peracetylated epigallocatechin 3- O -(2' \rightarrow O \rightarrow 4'')-gallate (500 MHz, CDCl_3 , relative to TMS).



The samarangenin B was obtained in subfractions F#16#7 and F#17#8 (59.5 mg) and represents 0.3% of the FAE. The analyses by LC-DAD-MS and MSⁿ showed the peak at 14.9 min for subfractions F#16#7 and deprotonated ions at m/z 911.1315 [M-H]⁻ compatible with C₄₄H₃₁O₂₂⁻ (error: 0.3 ppm); the presence of galloyl units were confirmed by the losses of 152 *u* (galloyl). The paracetylated substance showed $[\alpha]_D^{20}$: -74.2 (acetone, c 1.55) and $[\alpha]_D^{20}$: -64.5 (methanol, c 0.3). The H-6 (A) and H-8 (A) at δ 6.35/6.44, as well as the H-2 (F) at δ 4.82 means interflavanyl bond (4→8). Complementary, the CD spectrum (Figura 9), with positive Cotton effect at 213-224 nm, is similar to the dimeric prodelphinidins with a substituent in the lower unit and complied to to 4R configuration (Botha et al., 1978; 1981; Mello et al., 1996). The galloyl from upper unit do not seems to influence the CD spectrum. The peracetylated substance was analysed by NMR. The ¹H spectrum and NMR data (Figure 10 and Table 5) shows the presence of two flavan-3-ol unit, both related to the *cis*-configuration ($J_{2,3} \leq 1.0$ Hz) characteristic for epigallocatechin units. The H-3 (C) showed correlation, by HMBC, with the carbon of carbonyl (δ 161.8 ppm), as well as the H-3 (F) with second carbonyl (δ 162.3 ppm). The two protons singlet at δ 7.63 ppm (integral 0.0107 for 3 protons) confirmed the presence of the galloyl unit at C-3(C). This singlet is overlaid with a doublet, which has a correlation with the doublet at δ 7.44 ppm. Both doublets are part of the second galloyl unit (HMBC with carbonyl at δ 162.3 ppm), and it is linked at C-3(F). The presence of two doublets instead of one singlet of two proton suggested a substituent at C-3''' of galloyl unit. This linkage happens with the C-2'(B), because as showed for epigallocatechin 3-*O*-(2'→*O*→4'')-gallate, the H-2(C) has correlation (¹H/¹H-COSY), with one proton singlet at δ 7.30 ppm (integral 0.0034). Besides, the 2D-NMR-COSY showed the correlation with a proton at δ 4.52, 5.86, and 5.99 ppm, corresponding to H-4, H-3 and H-2, respectively. The value of an integral of H-4 (0.0038) confirmed these protons belong to upper unit. Therefore it was confirmed the added linkage is between B-ring and galloyl below. The 2D-COSY also showed the correlation between H-2(F) (δ 4.82 ppm) and two protons singlet, which belonging to H-2' and H-6' of E-ring at δ 6.55 ppm (integral = 0.0074). The data are compatible to data published previously (Lin et al., 2000; Nonaka et al., 1992). The COSY and HMBC correlations confirmed the position of each proton and carbon. This compound was isolated and identified as Samarangenin for the first time in the *Limonium brasiliense*.

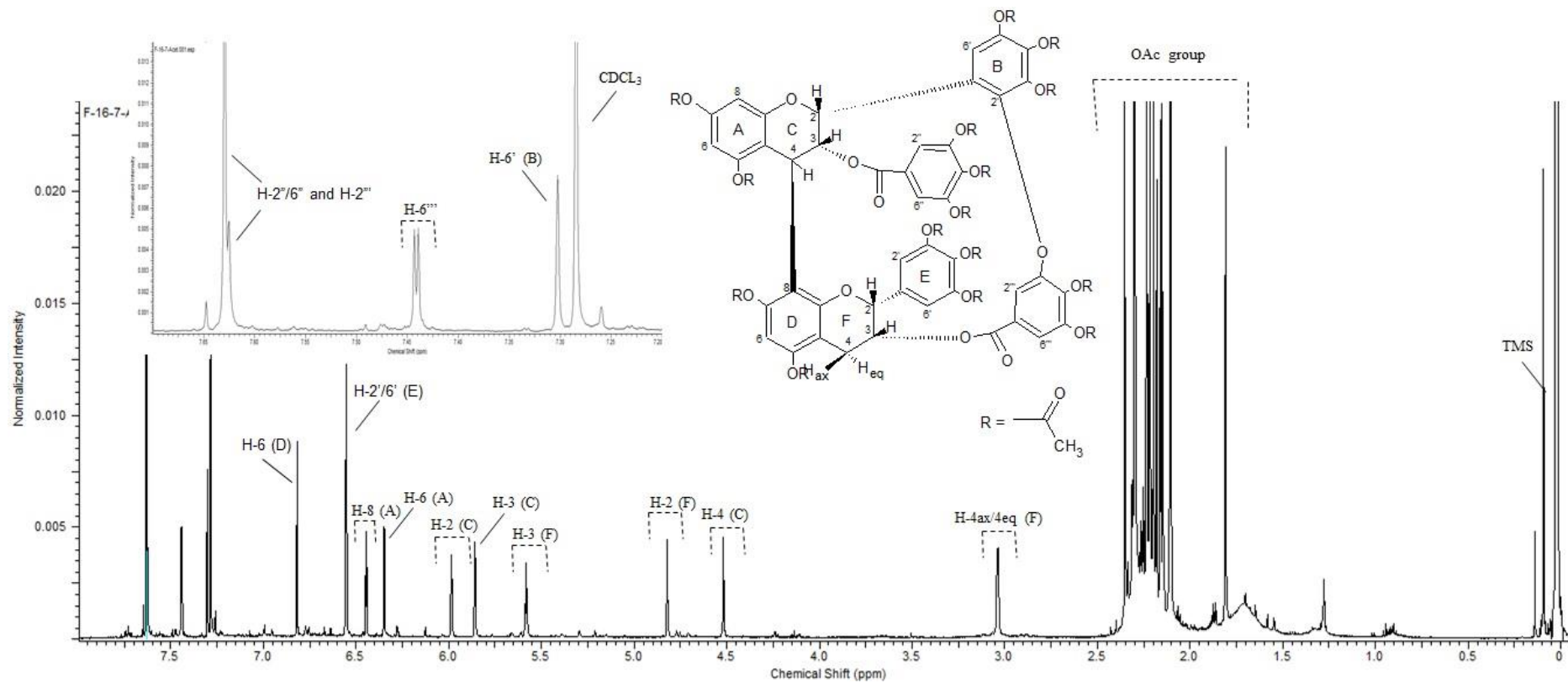
Figure 9. CD-Spectrum of the peracetylated samarangenin B (methanol, c 38.75 µg/ml).**Table 5.** NMR-Data of the peracetylated samarangenin B (500 MHz/¹H, 125 MHz/¹³C, CDCl₃, relative to TMS).

H/C	¹ H δ (ppm)	Multiplicity/J (Hz)	Integrals	¹³ C δ (ppm)	HMBC
O-Ac group	1.81 – 2.3	m		20.1 – 21.2 166.4-169.3	
4 _{ax} /4 _{eq} (F)	3.04	br d	0.0076	27.4	68.9 (3 F-ring) 77.4 (2 F-ring) 111.1 (10 D-ring) 149.4 (5 D-ring) 153.0 (9 D-ring)
4 (C)	4.52	s	0.0038	35.4	70.6 (2 C-ring) 71.8 (3 C-ring) 111.2 (10 A-ring) 115.6 (8 D-ring) 148.8 (5 A-ring) 154.0 (9 A-ring)
2 (F)	4.82	s	0.0037	77.4	27.4 (4 F-ring) 68.9 (3 F-ring) 118.0 (2'/6' E-ring) 134.1 (1' E-ring)
3 (F)	5.58	m	0.0039	68.9	111.1 (10 D-ring) 162.3 (C-7''')
3 (C)	5.86	m	0.0037	71.8	35.4 (4 C-ring) 70.6 (2 C-ring) 111.2 (10 A-ring) 115.6 (8 D-ring) 161.8 (C-7'')
2 (C)	5.99	m	0.0037	70.6	71.8 (3 C-ring) 128.7 (1' B-ring) 121.4 (6' B-ring) 144.1 (2' B-ring)

6 (A)	6.35	d ${}^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2.2$	0.0038	110.1	108.3 (8 A-ring) 111.2 (10 A-ring) 148.8 (5 A-ring) 149.2 (7 A-ring)
8 (A)	6.44	d ${}^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2.2$	0.0038	108.3	110.1 (6 A-ring) 149.2 (7 A-ring) 154.0 (9 A-ring)
2'/6' (E)	6.55	s	0.0074	118.0	77.4 (2 F-ring) 118.0 (2'/6' E-ring) 134.6 (4' E-ring) 143.2 (3'/5' E-ring)
6 (D)	6.82	s	0.0037	110.6	111.1 (10 D-ring) 115.6 (8 D-ring) 148.8 (7 D-ring) 149.4 (5 D-ring)
6' (B)	7.30	s	0.0034	121.4	70.6 (2 C-ring) 128.7 (1' B-ring) 136.1 (4' B-ring) 138.0 (5' B-ring) 140.6 (3' B-ring) 144.1 (2' B-ring)
6'''	7.44	d ${}^4J_{\text{H-6'''-H-2'''}} = 1.8$	0.0037	122.4	128.4 (C-1''')
2'''	7.63	d overlapping	0.0107	122.7	139.1 (C-4''')
2''/6''	7.63	s		122.8	143.6 (C-3''')
					144.7 (C-5''')
					162.4 (C-7''')
					122.8 (C-2''/6'')
					127.5 (C-1'')
					139.3 (C-4'')
					149.2 (C-3''/5'')
					161.8 (C-7'')

δ = displacement; J = coupling constant; s = singlet; d = double; br d = broad doublet, m = multiplet

Figure 10. $^1\text{H-NMR}$ -Spectrum of the peracetylated samarangerin B (500 MHz, CDCl_3 , relative to TMS).



The epigallocatechin-3-*O*-(2'→*O*→3'')-gallate (4β→8)-epigallocatechin-3-*O*-gallate was obtained in subfraction F#17#7#P4 after the acetylation. The equivalent quantity in free form is 99.9 mg, that represents circa 0.5% of the FAE. The analyses by LC-DAD-MS and MS^{*n*} showed the peak at 14.9 min for subfractions F#17#7 and deprotonated ions at *m/z* 911.1339 [M-H]⁻ compatible with C₄₄H₃₁O₂₂⁻ (error: 2.9 ppm). The paracetylated substance showed $[\alpha]_D^{20}$: -78.7 (acetone, *c* 2.54) and the CD spectrum (Figura 11) showed positive Cotton effect at 213-224 nm, similar to samarangenin B, suggesting to a 4R configuration (Botha et al., 1978; 1981). The paracetylated substance was analysed by ¹H NMR and its spectrum and data are presents in Figure 12 and Table 6. As well the Samarangenin B, this structure showed the presence of two flavan-3-ol unit, both related to the *cis*-configuration ($J_{2,3} \leq 1.0$ Hz) characteristic for epigallocatechin units, and the add linkage with a galloyl unit and phenolic ring. By comparison, it is possible to observe the protons of C-ring is downfield shift, as well as the H-6'(B), than samarangenin B. It showed that the add linkage is the B-ring with upper galloyl unit.

Figure 11. CD-Spectrum of the paracetylated epigallocatechin-3-*O*-(2'→*O*→3'')-gallate (methanol, *c* 6.35 μg/ml).

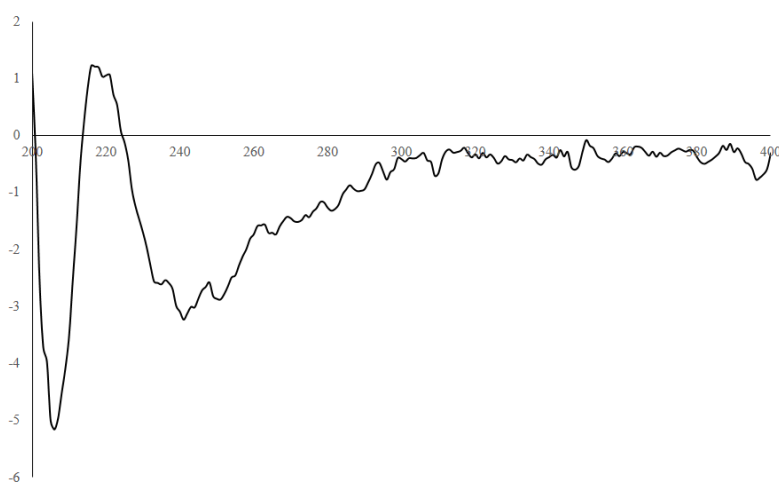
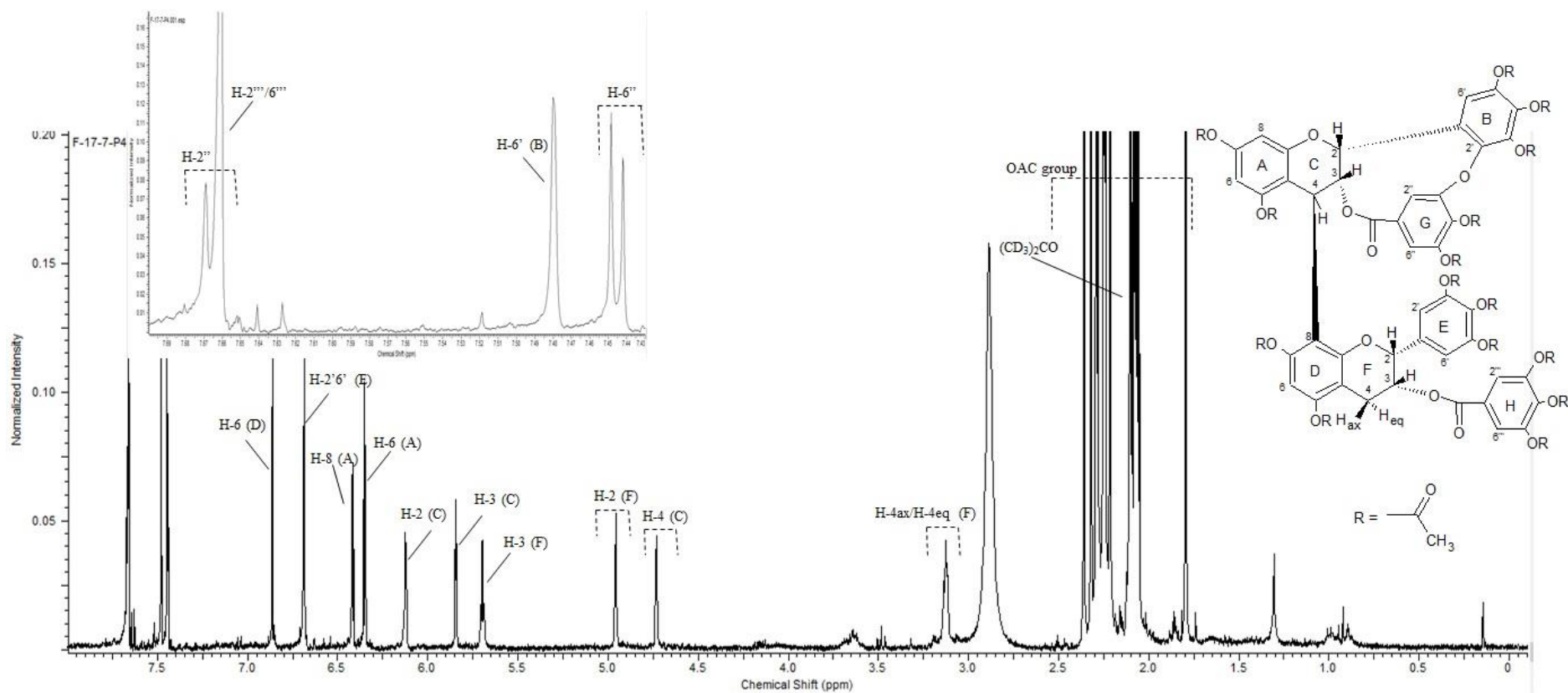


Table 6. ^1H NMR-Data of the peracetylated epigallocatechin-3-*O*-(2' \rightarrow *O* \rightarrow 3'')-gallate (4 β \rightarrow 8)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, relative to TMS).

H/C	^1H δ (ppm)	Multiplicity/J (Hz)	Integrals
O-Ac group	1.80 – 2.36	m	
4 _{ax} /4 _{eq} (F)	3.13	m	0.0133 (2H)
4 (C)	4.73	br s	0.0065
2 (F)	4.96	br s	0.0068
3 (F)	5.70	m	0.0071
3 (C)	5.84	m	0.0068
2 (C)	6.12	br s	0.0068
6 (A)	6.35	d $^4J_{\text{H-6-H-8}} = 2.2$	0.0069
8 (A)	6.42	d $^4J_{\text{H-8-H-6}} = 2.2$	0.0072
2'/6' (E)	6.69	s	0.0143 (2H)
6 (D)	6.86	s	0.0067
6''	7.44	d $^4J_{\text{H-6''-H-2''}} = 1.8$	0.0069
6' (B)	7.48	br s	0.0069
2'''/6'''	7.66	s	0.0205 (3H)
2''	7.67	d	

δ = displacement; J = coupling constant; s = singlet; d = double; m = multiplet

Figure 12. $^1\text{H-NMR}$ -Spectrum of the peracetylated epigallocatechin-3-*O*-(2' \rightarrow *O* \rightarrow 3'')-gallate (4 β \rightarrow 8)-epigallocatechin-3-*O*-gallate (500 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, relative to TMS).



The epigallocatechin gallate (4 β →8) epigallocatechin gallate was obtained in subfraction F#18#9 (34.1 mg) and represents 0.2% of the FAE. The analyses by LC-DAD-MS and MSⁿ showed the peak at 13.2 min for subfraction F#18#9 and deprotonated ions at m/z 913.1487 [M-H]⁻ compatible with C₄₄H₃₃O₂₂⁻; the presence of galloyl units were confirmed by the losses of 152 *u* (galloyl) (Erşan et al., 2016; Guaratini et al., 2014). The paracetylated substance showed $[\alpha]_D^{20}$: -54.4 (acetone, c 2.7) and $[\alpha]_D^{20}$: -63.0 (methanol, c 0.5). The H-6 (A) and H-8 (A) at δ 6.31, as well as the H-2 (F) at δ 4.76 means interflavanyl bond (4→8). Complementary, the CD spectrum (Figura 13) showed the characteristic Cotton effect for 4R configuration, in according to previous reports for the (4 β →8)-linkage (Botha et al., 1978; 1981; Mello et al., 1996). It is noted a positive tendency for Cotton effect it ca. 217 nm is maybe influenced by the presence of Samarangenin B. The paracetylated substance was analysed by NMR. The ¹H spectrum and NMR data (Figure 14 and Table 7) shows the presence of two flavan-3-ol unit, both related to the *cis*-configuration ($J_{2,3} \leq 1.0$ Hz) characteristic for epigallocatechin units. The H-3 of C- and F-rings are in downfield shift (δ 3.28-3.63) due to galloyl substituents. The 2D-COSY showed the correlation between H-2(C) (δ 5.65 ppm) and a two protons singlet (δ 7.21 ppm, integral = 0.0031), as well as the H-2(F) (δ 4.76 ppm) which a other the two protons singlet (δ 7.07 ppm, integral = 0.0034) belonging to H-2' and H-6' of, respectively, B- and E-ring. The ¹H spectrum also shows the presence of two singlets of two protons (δ 7.56 ppm, integral = 0.0028; δ 7.74 ppm, integral = 0.0027) belonging to galloyl units. The HMBC spectrum confirm the correlation with signals at δ 162.6 and δ 164.1 ppm correspondent to carbonyl carbons. The COSY and HMBC correlations confirmed the position of each proton and carbon. This spectrum showed that the compound is not pure because it was observed the intense presence of samarangenin B. The data are compatible to the data previously published (Mello et al., 1996).

Figure 13. CD-Spectrum of the peracetylated epigallocatechin gallate (4 β →8) epigallocatechin gallate (methanol, c 6.75 μ g/ml).

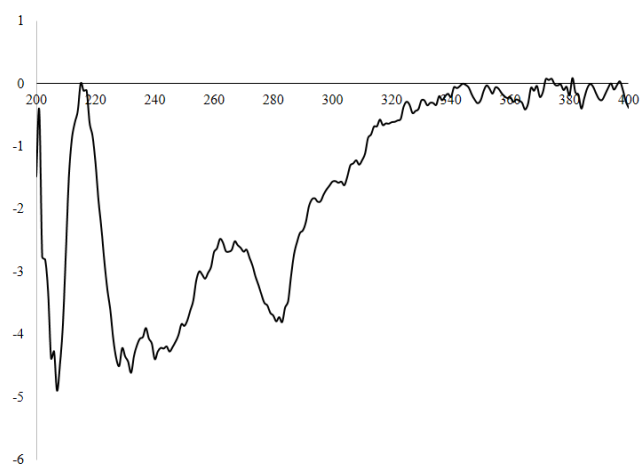
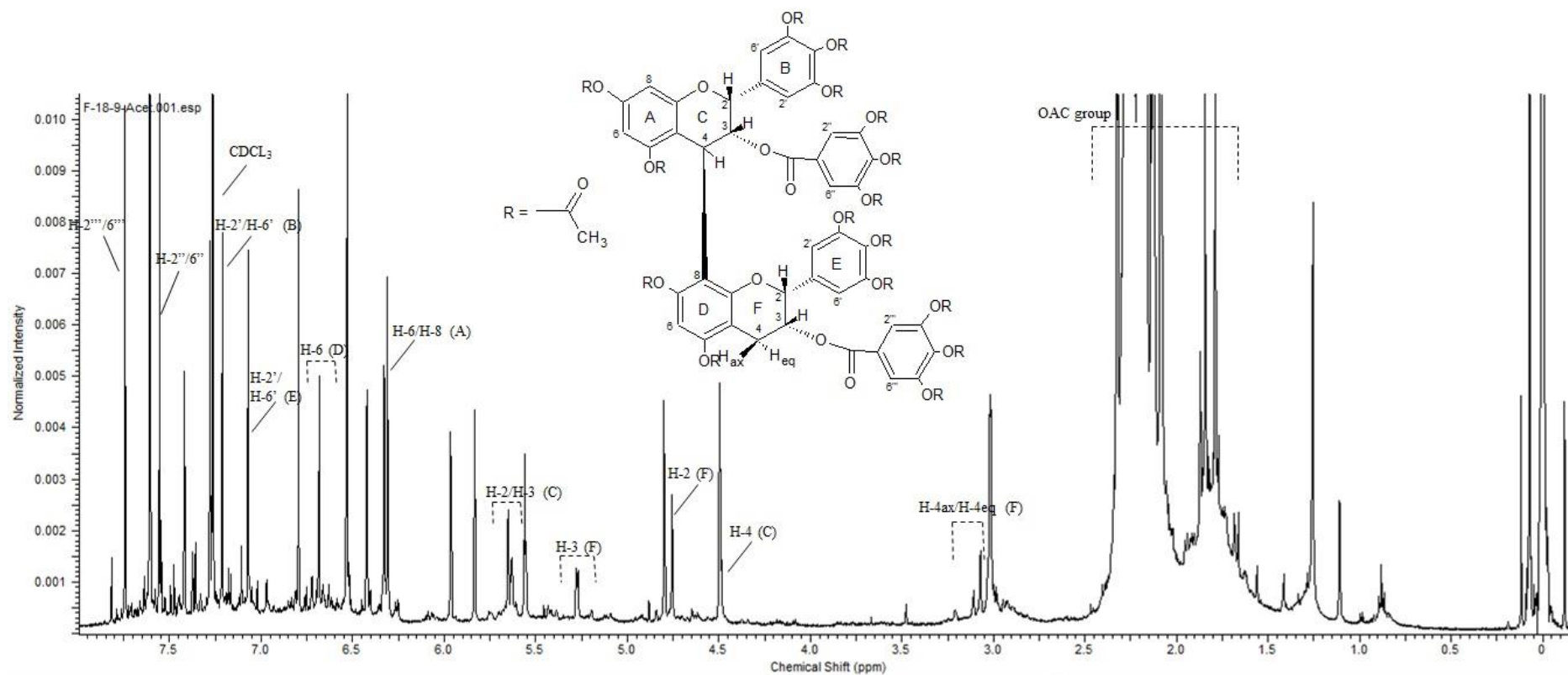


Table 7. NMR-Data of the peracetylated epigallocatechin gallate (4 β →8) epigallocatechin gallate (500 MHz/¹H, 125 MHz/¹³C, CDCl₃, relative to TMS).

H/C	¹ H- δ (ppm)	Multiplicity J (Hz)	Integrals	¹³ C- δ (ppm)	HMBC
OAc group	1.79-2.33	m		19.9-21.1 166.2-169.4	
4ax/4eq (F)	3.07-3.11	br d	0.0030	26.4	68.8 (3 F-ring) 77 (2 F-ring) 111 [#] (10 A-ring) 148.9 (5 A-ring) 154.8 (9 A-ring)
4 (C)	4.49	br s	0.0010	Not visible	Not visible
2 (F)	4.76	br s	0.0019	77*	68.8 (3 F-ring) 118.5 (2'/6' E-ring) 134.0 (1' E-ring)
3 (F)	5.28	m	0.0020	68.8	Not visible
3 (C)	5.63	m	0.0020	72.0	Not visible
2 (C)	5.65	br s	0.0021	73.8	72.0 (3 C-ring) 119.0 (2'/6' B-ring)
6/8 (A)	6.31	false t	0.0032	109.4	111 [#] (10 A-ring) 149.4 (5 A-ring) 154.8 (9 A-ring)
6 (D)	6.68	s	0.0020	111.0	111 [#] (10 D-ring) 116 [#] (8 D-ring) 148.6 (5 D-ring)
2'/6' (E)	7.07	s	0.0034	118.5	77 (2 F-ring) 118.5 (2'/6' E-ring) 134.0 (1' E-ring) 143.4* (3'/5' E-ring)
2'/6' (B)	7.21	s	0.0031	119.0	73.8 (2 C-ring) 119.0 (2'/6' C-ring) 134.5 (1' C-ring) 143.4** (3'/5' C-ring)
2''/6''	7.56	s	0.0028	122.6	122.6 (2''/6'') 127.2 (1'') 139*** (4'') 143.4** (3''/5'') 162.6 (7'')
2'''/6'''	7.74	s	0.0027	122.1	122.1 (2'''/6''') 127.6 (1''') 139*** (4''') 143.4** (3'''/5''') 164.1 (7''')

δ = displacement; J = coupling constant; s = singlet; br s = broad singlet; br d = broad doublet, m = multiplet; t = triplet; * Behind CDCl₃ signal; **Not clear: 143.14, 143.33, 143.35 or 143.40; *** Not clear: 138.90 or 139.10; # Not clear

Figure 14. $^1\text{H-NMR}$ -Spectrum of the peracetylated epigallocatechin gallate ($4\beta\rightarrow 8$) epigallocatechin gallate (500 MHz, CDCl_3 , relative to TMS).



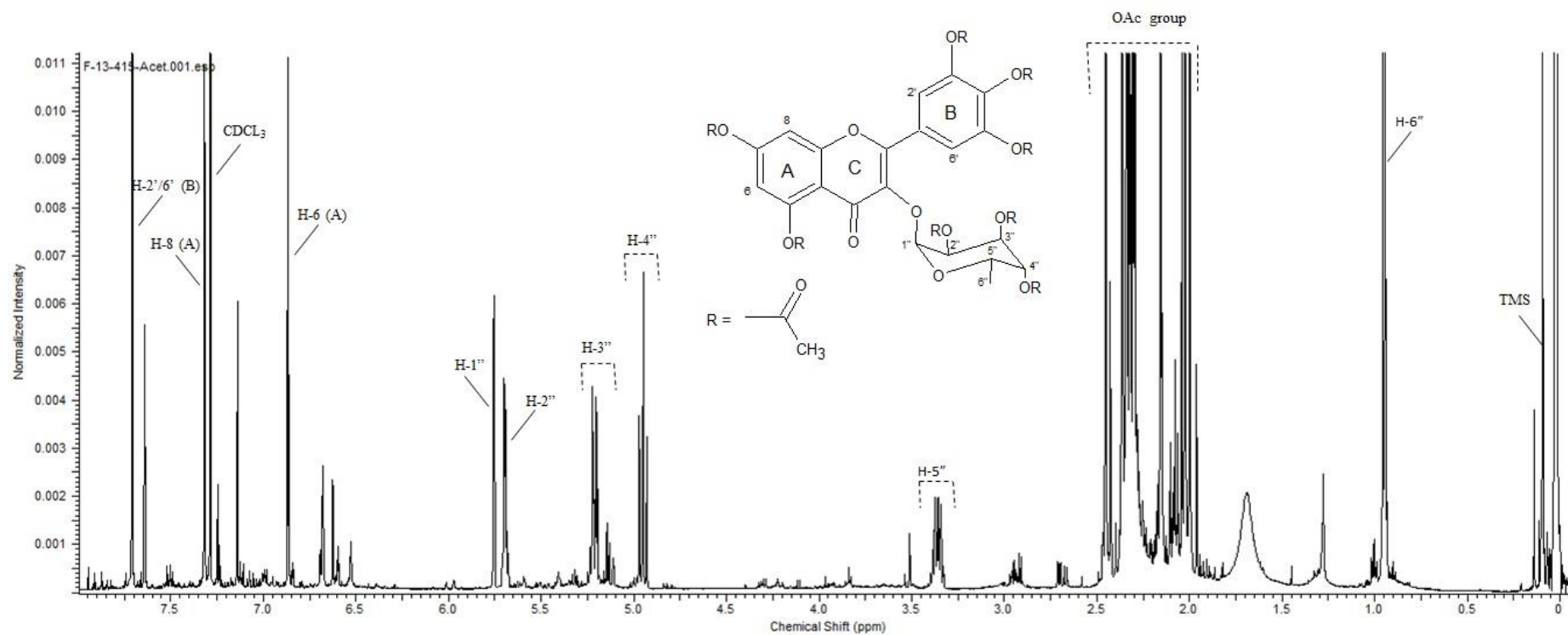
The myricetin-3-*O*- α -L-rhamnoside was obtained in subfraction F#13#4/5 (15.4 mg) and represents 0.08% of the FAE. The analyses by LC-DAD-MS and MSⁿ showed the peak at 17.9 min for subfraction F#13#4/5 and deprotonated ions at *m/z* 463.0884 [M-H]⁻ compatible with C₂₁H₁₉O₁₂⁻ (error: 0.5 ppm). The paracetylated substance showed $[\alpha]_D^{20}$: -57.8 (acetone, c 1.16); $[\alpha]_D^{20}$: -77.6 (methanol, c 0.2). The paracetylated substance was analysed by NMR. The ¹H spectrum and NMR data (Figure 15 and Table 8) shows the presence of anomeric carbon (δ 97.91 ppm), which has a correlation with a three protons singlet at δ 0.95 ppm (integral = 0.0200). This methyl group is characteristic of rhamnoside unit at position C-6". Besides, there is no proton at C-ring. The H-2' and H-6' of B-ring at δ 7.71 ppm (integral = 0.0125) is correlated with a carbon at δ 153.3 ppm corresponding to C-2 with double bond between C-3. In the 2D-NMR (COSY and HMBC) correlations confirmed the position of each proton and carbon, and the data are compatible to data previously published (Korul'kina et al., 2004; Murray et al., 2004; Ye and Huang, 2006). This spectrum showed the signals characteristic of the presence of gallo catechin as minor substance. This compound was isolated previously in the *Limonium* genus.

Table 8. NMR-Data of the peracetylated myricetin-3-*O*- α -L-rhamnoside (500 MHz/¹H, 125 MHz/¹³C, CDCl₃, relative to TMS).

Position	¹ H δ (ppm)	Multiplicity/J (Hz)	Integrals	¹³ C δ (ppm)	HMBC
6''	0.95	d ³ J _{H-6'-H-5'} = 6.1	0.0200	17.0	68.8 (C-4'') 97.9 (C-1'')
O-Ac group	2.02 – 2.46	m			68.9 (C-2'') / 69.0 (C-3'') 70.1 (C-4'') / 154.1 (C-7) 150.4 (C-5) / 137.1 (C-4') 143.9 (C-3'/5')
5''	3.33-3.40	m ³ J _{H-5'-H-6'} = 6.1 ³ J _{H-5'-H-4'} = 9.8	0.0086	68.8	17.0 (C-5'') 70.1 (C-4'') 97.9 (C-1'')
4''	4.93-4.97	False t ³ J _{H-4'-H-5'} = 9.8 10.07	0.0084	70.1	69.0 (C-3'') 17.0 (C-1'')
3''	5.20-5.22	dd ³ J _{H-3'-H-4'} = 9.8 ³ J _{H-3'-H-2'} = 3.4	0.0094	69.0	70.1 (C-4'')
2''	5.70	dd ³ J _{H-2'-H-1'} = 1.8 ³ J _{H-2'-H-3'} = 3.4	0.0077	68.9	70.1 (C-4'') 97.9 (C-1'')
1''	5.75	d ³ J _{H-1'-H-2'} = 1.8	0.0065	97.9	68.9 (C-2'') 137* (C-3)
6 (A)	6.87	d ⁴ J _{H-6-H-8} = 2.1	0.0065	113.7	154.1 (C-7) 150.4 (C-5) 115.1 (C-10) 108.9 (C-8)
8 (A)	7.31	d ⁴ J _{H-8-H-6} = 2.1	0.0066	108.9	113.7 (C-6) 115.1 (C-10) 154.1 (C-7) 156.6 (C-9)
2'/6' (B)	7.71	S	0.0125	121.3	153.3 (C-2) 143.9 (C-3'/5') 137.1 (C-4') 127.9 (C-1')

δ = displacement; J = coupling constant; br = broad; s = singlet; d = double; m = multiplet; *not visible in ¹³C spectrum.

Figure 15. ^1H NMR-Data of the peracetylated myricetin-3-*O*- α -L-rhamnoside (500 MHz, CDCl_3 , relative to TMS).



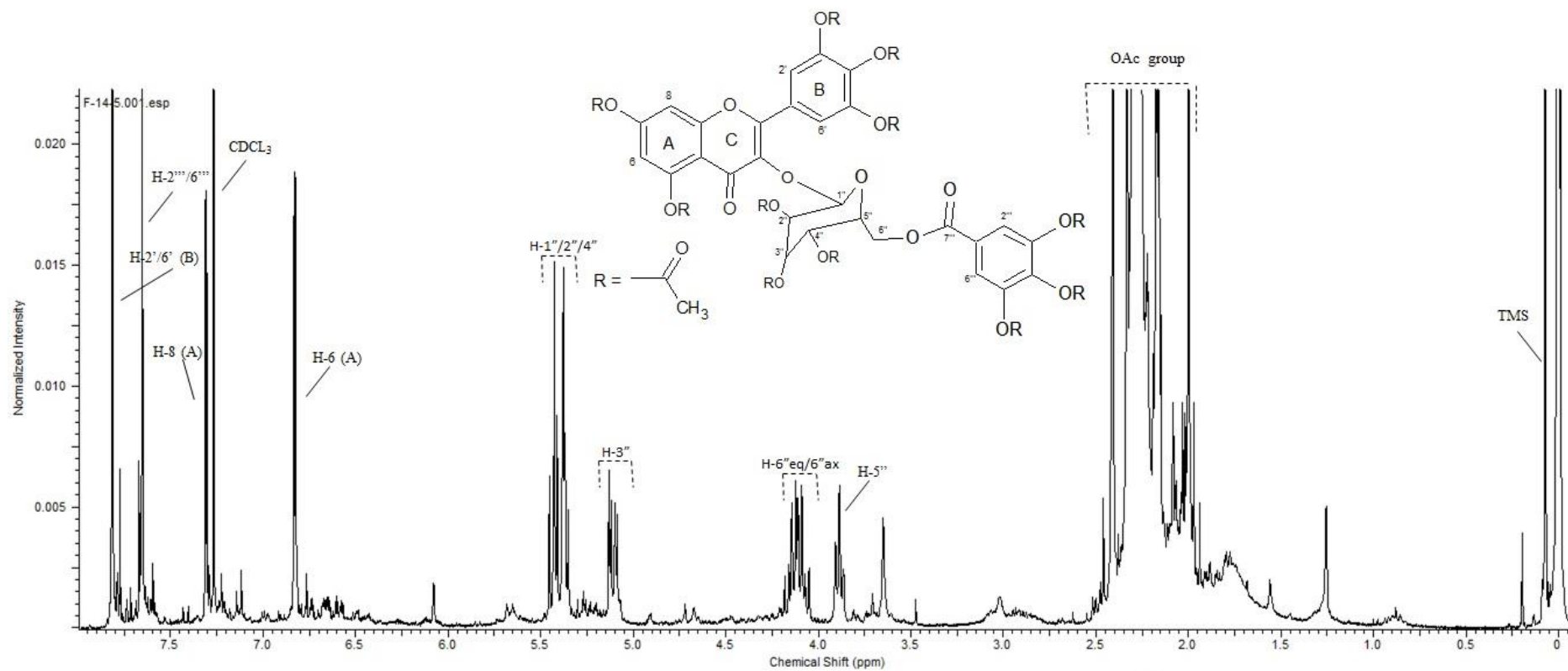
The myricetin-3-*O*- β -D-galactoside-6"-gallate was obtained in subfraction F#14#5 (39.6 mg) and represents 0.2% of the FAE. The analyses by LC-DAD-MS and MSⁿ showed the peak at 15.2 min for subfraction F#14#5 and deprotonated ions at m/z 631.0949 [M-H]⁻ compatible with C₂₈H₂₃O₁₇⁻ (error: 1.3 ppm). The paracetylated substance showed $[\alpha]_D^{20}$: -20.5 (acetone, c 2.29) and $[\alpha]_D^{20}$: -10.9 (methanol, c 0.4). The peracetylated substance was analysed by NMR. The ¹H spectrum and NMR data (Figure 16 and Table 9) shows the presence of the glycoside and galloyl units. By HMBC, it is possible to confirm the linkage between C-3 (δ 137.1 ppm) with the anomeric hydrogen (H – δ 5.37 ppm; C – δ 100.0 ppm). The two protons singlet at δ 7.82 ppm corresponding to H-2' and 6' of B-ring, and there is a correlation with C-2 (δ 153.8 ppm). The two protons singlet at δ 7.65 ppm corresponding to H-2''' and 6''' of galloyl unit, because there is a correlation with C-7''' at δ 163.5 ppm. The position of galloyl unit is confirmed by correlation of H-6'' with the carbonyl C-7'''. The COSY and HMBC correlations confirmed the position of each proton and carbon, and the data are compatible to data previously published (Korul'kina et al., 2004; Ye and Huang, 2006).

Table 9. NMR-Data of the peracetylated myricetin-3-*O*- β -D-galactoside-6''-gallate (500 MHz/¹H, 125 MHz/¹³C, CDCl₃, relative to TMS).

H/C	¹ H δ (ppm)	Multiplicity/J (Hz)	Integrals	¹³ C δ (ppm)	HMBC
O-Ac group	2.00 – 2.41	m		20.2-21.2 166.3-171.9	70.6 (C-3'') 66.9 (C-4'') 69.0 (C-2'') 150.1 (C-5) 154.0 (C-7) 138.8 (C-4''') 143.4 (C-3'''/5''') 136.8 (C-4') 143.2 (C-3'/5')
5''	3.89	false t	0.0096	71.0	62.3 (C-6'') 100.0 (C-1'') 66.9 (C-4'')
6''	4.05-4.11	dd ² J _{H-6''-H-6'''} = 11.4 ³ J _{H-6''-H-5'''} = 6.2	0.0089	62.3	66.9 (C-4'') 71.0 (C-5'') 163.5 (C-7''')
6''	4.11-4.18	dd ² J _{H-6''-H-6'''} = 11.4 ³ J _{H-6''-H-5'''} = 6.8	0.00093		
3''	5.09-5-13	dd ³ J _{H-3''-H-4'''} = 9.9	0.0107	70.6	66.9 (C-4'') 69.0 (C-2'') 100.0 (C-1'')
4'' and 2''	5.35-5.45	dd+dd - overlaid	0.0219	66.9 69.0	69.0 (C-2'') 70.6 (C3'') 100.0 (C-1'')
1''	5.37	d J < 1	0.0045	100.0	137.1 (C-3)
6 (A)	6.83	d ⁴ J _{H-6-H-8} = 2.2	0.0101	113.5	109.0 (C-8) 115.0 (C-10) 143.2 (C-4) 150.1 (C-5) 154.0 (C-7)
8 (A)	7.31	d ⁴ J _{H-8-H-6} = 2.2	0.0078	109.0	113.5 (C-6) 115.0 (C-10) 154.0 (C-7) 156.5 (C-9)
2'''/6'''	7.65	S	0.0150	122.3	127.6 (C-1''') 138.8 (C-4''') 143.4 (C-3'''/5''') 163.5 (C-7''')
2'/6' (B)	7.82	S	0.0146	121.7	128.4 (C-1') 136.8 (C-4') 143.2 (C-3'/5') 153.8 (C-2)

δ = displacement; J = coupling constant; s = singlet; d = double; dd = doublet of doublets; m = multiplet

Figure 16. ^1H NMR-Data of the peracetylated myricetin-3-*O*- β -D-galactoside-6"-gallate (500 MHz, CDCl_3 , relative to TMS).



CONCLUSION

Phenolic substances are largely distributed in plants from the genus *Limonium* and gallo- and epigallocatechin, as well as its derivatives, and flavonoids as myricetin and its derivatives seem to be specially often (Geng et al., 2015; Korul'kina et al., 2004; Murray et al., 2004; Rodrigues et al., 2015; Rodrigues et al., 2016; Stankovic et al., 2015; Zhusupova, 2006; Zhusupova and Abil'kaeva, 2006a-b). We elucidate the substances as galocatechin, epigallocatechin, epigallocatechin gallate, epigallocatechin gallate-(4 β →8)-epigallocatechin gallate, myricetin-3-O- α -L-rhamnoside and myricetin-3-O- β -D-galactoside-6"-gallate. Besides, the unusual substance samarangenin B, previously identified in *L. sinense* (Girard) Kuntze (Lin et al. 2000), also could be found in *L. brasiliense*, as well as other two substances with same characteristic of double bond, by first time identified in plant material: epigallocatechin 3-O-(2'→O→4")-gallate and epigallocatechin-3-O-(2'→O→3")-gallate-(4 β →8)-epigallocatechin-3-O-gallate.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank A. Arantes and C. Novello for technical support during the experiments and Aché Laboratórios Farmacêuticos for providing the UV- and HPLC-Laboratories for analytical experiments. This study received support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Higher Education Staff Development Coordination (CAPES), FINEP, Araucária Foundation, FAPESP, and the Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if).

REFERENCE

- Antonelli-Ushirobira, T.; Blainski, A.; Gancedo, N.C.; Gaburo, F.; Cardoso, K.A.K.C.; Leite-Mello, E.V.S.; Mello, J.C.M.; Milaneze-Gutierrez, M.A., 2015a. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 25, 320–327.
- Ushirobira, T.; Blainski, A.; Fernandes, H.G.; Moura-Costa, G.F.; Costa, M.A.; Campos-Shimada, L.B.; Salgueiro-Pagadigorria, C.L.; Kaneshima, E.N.; Becker, T.C.A.; Leite-Mello, E.V.S.; Mello, J.C.P., 2015b. Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of *Limonium brasiliense* in mice and rats. *J. Ethnopharmacol.*, 174, 293–298.
- Botha, J.J.; Ferreira, D.; Roux, D.G., 1978. Condensed tannins. Circular dichroism method of assessing the absolute configuration at C-4 of arylflavan-3-ols, and stereochemistry of their formation from flavan-3-diols. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 698-700.
- Botha, J.J.; Young, D.A.; Ferreira, D.; Roux, D. G., 1981. Synthesis of condensed tannins. Part 1. Stereoselective and stereospecific syntheses of optically pure 4-arylflavan-3-ols, and assessment of their absolute stereochemistry at C-4 by means of circular dichroism. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1213-1219.
- Cardoso, M.L.C., 1990. *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae (Baicuru): Desenvolvimento galênico de extratos. Porto Alegre, 101 p. Master Dissertation, Post Graduation in Pharmacy.
- Erşan, S.; Üstündağ, O.G.; Carle, R.; Schweiggert, R.M., 2016. Identification of phenolic compounds in red and green pistachio (*Pistacia vera* L.) hulls (Exo- and Mesocarp) by HPLC-DAD-ESI-(HR)-MSⁿ. *J. Agric. Food Chem.*, 64, 5334–5344.

- Geng, D.; Chi, X.; Dong, Q.; Hu, F., 2015. Antioxidant screening in *Limonium aureum* by optimized on-line HPLC–DPPH assay. *Ind. Crops. Prod.*, 67, 492–497.
- Guaratini, T.; Armelini, A.I.S.P.V.; Ferrari, C.R.; Schefer, R.R.; Neto, A.P.; Navas, R.; Reigada, J.B.; Silva, D.B., 2014. Application of matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight LIFT for identification of cocoa condensed tannins. *J. Mass Spectrom.*, 49, 251–255.
- Korul'kina, L.M.; Schul'ts, E.E.; Zhusupova, G.E.; Abilov, Z.A.; Erzhanov, K.B.; Chaudri, M.I. 2004. Biologically active compounds from *Limonium gmelinii* and *L. popovii*. *Chem Nat Compd*, 40, 465-471.
- Korver, O.; Wilkins, C.K., 1971. Circular dichroism spectra of flavanols. *Tetrahedron*, 27, 5459-5465.
- Lin, L.C.; Kuo, Y.C.; Chou, C.J. 2000. Anti-Herpes Simplex Virus Type-1 Flavonoids and a New Flavanone from the root of *Limonium sinense*. *Planta Med*, 66, 333-336.
- Mello, J.P., Petereit, F., Nahrstedt, A. 1996. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodedron adstringens*. *Phytochem*, 41, 807-813.
- Moura, T.F.A.L., 1984. Sobre o *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, o baicuru da Farmacopeia Brasileira I. Porto Alegre, 146 p. Master Dissertation, Post Graduation in Pharmacy.
- Mueller-Harvey, I., 2001. Analysis of hydrolysable tannins. *Anim. Feed Sci. Tech.* 91, 3–20.
- Murray, A.P., Rodriguez, S., Frontera, M.A., Tomas, M.A., Mulet, M.C., 2004. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Z. Naturforsch.* 59c, 477–480.
- Nonaka, G.; Aiko, Y.; Aritake, K.; Nishioka, I., 1992. Tannins and Related Compounds. CXIX. ¹⁾ Samarangenins A and B, Novel Proanthocyanidins with Doubly Bonded Structures, from *Syzygium samarangens* and *S. aqueum*. *Chem Pharm Bull*, 40, 2671-2673.
- Rodrigues, M.J.; Neves, V.; Martins, A.; Rauter, A.P.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.F.; Varela, J.; Barreira, L.; Custódio, L., 2016. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of *Limonium algarvense* flowers' infusions and decoctions: A comparison with green tea (*Camellia sinensis*). *Food Chem.*, 200, 322–329.
- Rodrigues, M.J.; Soszynski, A.; Martins, A.; Rauter, A.P.; Neng, N.R.; Nogueira, J.M.F.; Varela, J.; Barreira, L.; Custódio, L. 2015. Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Ind. Crops Prod.*, 77, 315–322.
- Rosito-Filho, J., 1975. Contribuição à análise das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.). Porto Alegre, 39 p. Master Dissertation, Post Graduation in Pharmacy.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 91, 21–40.
- Stankovic, M.S.; Petrovic, M.; Godjevac, D.; Stevanovic, Z.D., 2015. Screening inland halophytes from the central Balkan for their antioxidant activity in relation to total phenolic compounds and flavonoids: Are there any prospective medicinal plants? *J. Arid. Environ.*, 120, 26–32.
- Ye, G.; Huang, C. 2006. Flavonoids of *Limonium aurium*. *Chem Nat Compd*, 42, 232-234.
- Zhusupova, G.E., 2006. Amino-acid and mineral composition of substances from the aerial part and roots of *Limonium gmelinii*. *Chem. Nat. Compd.*, 42, 123–124.
- Zhusupova, G.E.; Abil'kaeva, S.A., 2006a. Dimeric prodelphinidins from *Limonium gmelinii* roots - III. *Chem. Nat. Compd.*, 42, 164–168.
- Zhusupova, G.E.; Abil'kaeva, S.A., 2006b. Flavones from *Limonium gmelinii* - II. *Chem. Nat. Compd.*, 42, 112–113.

4 CONCLUSÃO

Pelo presente trabalho, parâmetros de controle de qualidade farmacognóstico por métodos farmacopeicos e não-farmacopeicos foram determinados para os rizomas de *Limonium brasiliense* contribuindo para a determinação de critérios de qualidade vegetal dessa espécie. O método por CLAE para a separação de polifenóis e quantificação de galocatequina (GC) e epigalocatequina (EGC) na fração acetato de etila apresentou-se satisfatório quanto aos requisitos de validação analítica (linearidade, especificidade, precisão e exatidão). Além disso, o perfil cromatográfico, tanto por CLAE como cromatografia em camada delgada (CCD) mostraram ser característicos dessa droga vegetal. O planejamento estatístico de misturas (centroide simplex) avaliou a influência da extração por componentes quaternários (água, metanol, acetona e etanol) e demonstrou que é possível prever o teor de polifenóis e GC da mistura em qualquer proporção desses solventes por modelos quadrático e cúbico especial, respectivamente. A análise de componente principal (PCA) e de agrupamentos hierárquica (HCA) dos espectros de ultravioletas dos picos presentes no cromatograma demonstrou a presença homogênea de compostos flavan-3-ols. A análise destas amostras por espectrometria de massas (LC-DAD-MS) confirmou a presença de ácido gálico, galocatequina e epigalocatequina, assim como prodelfinidinas monoméricas e diméricas. Além disso, o planejamento por centroide simplex demonstrou ser uma forma viável e sistematizada de investigação de atividades biológicas, uma vez que disponibiliza extratos que não seriam comumente planejados tendo como base o conhecimento etnofarmacológico ou o foco em grupos químicos específicos. Neste sentido, as amostras foram testadas contra cepas multirresistentes e demonstraram um ótimo potencial, especialmente em bactérias Gram-positivas, como *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina (VRE_{fm}) e *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA). Estes resultados evidenciam o forte potencial do extrato ou frações da droga vegetal para o desenvolvimento de novos medicamentos antibacteriano. É interessante destacar que, de acordo com o estudo fitoquímico dos polifenóis, essa planta contém, flavonoides e taninos, como miricetina-3-O- α -L-ramnosídeo, miricetina-3-O- β -D-galactosídeo-6"-galato, galocatequina, epigalocatequina-3-O-galato e monômeros e dímeros do tipo B com unidades de galato ligadas atipicamente em dois pontos, como: epigalocatequina-3-O-(2'→O→4")-galato e epigalocatequina-3-O-(2'→O→3")-galato (4 β →8) epigalocatequina-3-O-galato, pela primeira vez isoladas de fonte natural, além da samarangenina B, esta já isolada em outras espécies vegetais.

5 REFERÊNCIAS

- AHN, H.I.; XU, Y.; DAVIDGE, S.T. Epigallocatechin-3-O-gallate inhibits TNF α -induced monocyte chemotactic protein-1 production from vascular endothelial cells. *Lifes Sciences*, v.82, p. 964-8, 2008.
- AKTURK, H.; SUTCU, M.; SOMER, A.; AYDIN, D.; CIHAN, R.; OZDEMIR, A.; COBAN, A.; INCE, Z.; CITAK, A.; SALMAN, N. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: risk factors for progression to infection. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 20, n. 2, p. 134-40, 2016.
- ALESSIO, H.M.; HAGERMAN, A.E.; FULKERSON, B.K.; AMBROSE, J.; RICE, R.E.; WILEY, R.L. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v. 32, n. 9, p. 1576-81, 2000.
- ALESSIO, H.M.; HAGERMAN, A.E.; NAGY, S.; PHILIP, B.; BYRNES, R.N.; WOODWARD, J.L.; CALLAHAN, P.; WILEY, R.L. Exercise improves biomarkers of health and stress in animals fed libitum. *Physiology & Behavior*, v. 84, p. 65-72, 2005.
- ALESSIO, H.M.; HAGERMAN, A.E.; RAMANELLO, M.; CARANDO, S.; THRELKELD, S.; ROGERS, J.; DIMITROVA, Y.; MUHAMMED, S.; WILEY, R.L. Consumption of Green tea protects rats from exercise-induced oxidative stress in kidney and liver. *Nutrition research*, v. 22, p. 1177-88, 2002.
- ALMEIDA, M.C.L. Sepsis de origem hospitalar por *Klebsiella* spp. em unidades neonatais: evolução clínica. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 61 f., 2005.
- ALONSO, J.R. *Tratado de fitomedicina bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: Indusgraf S.A., 1998. p.17.
- ANIYA, Y.; MIYAGI, C.; NAKANDAKARI, A.; KAMIYA, S.; IMAIZUMI, N.M ICHIBA, T. Free radical scavenging action of the medicinal herb *Limonium wrightii* from the Okinawa islands. *Phytomedicine*, v.9, p.239-44, 2002.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; McDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, v.127, p.183-198, 2002.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T.; BLAINSKI, A.; GANCEDO, N.C.; GABURO, F.; CARDOSO, K.A.K.C.; LEITE-MELLO, E.V.S.; MELLO, J.C.M. MILANEZE-GUTIERRE, M.A. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 320-7, 2015a.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; BLAINSKI, A.; FERNANDES, H.G.; MOURA-COSTA, G.F.; COSTA, M.A.; CAMPOS-SHIMADA, L.B.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C.L.; KANESHIMA, E.N.; BECKER, T.C.A.; LEITE-MELLO, E.V.S.; MELLO, J.C.P. 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. 293-8, 2015b.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M. Avaliação etnofarmacológica e toxicológica pré-clínica in vivo do extrato bruto dos rizomas de *Limonium brasiliense*. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 112 f., 2015.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26 - Registro de medicamentos fitoterápicos e registro e notificação de produtos tradicionais fitoterápicos - de 13 de maio de 2014. Brasília, DF. 2014.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resultado da Consulta de Produtos de Empresas – Medicamento. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentosPersistir.asp. Acesso em: 30 de setembro de 2012.
- AQUINO, R.; MORELI, S.; TOMAINO, A.; PELLEGRINO, M.; SAIJA, A.; GRUMETTO, L.; PUGLIA, C. VENTURA, D. BONINA, F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Culcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 183-91, 2002.
- ASTIN, J.A. Why patients use alternative medicine: results of a national study. *Journal of the American Medical Association*, v. 279, p. 1548-53, 1998.
- AYLIFFE, G.A.J. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 24, s. 1, p. 74-9, 1997.

- AZEVEDO, M.E.F. Identificação de *Enterococcus* spp. e avaliação da ocorrência de genes de resistência à vancomicina em amostras de pacientes de hospitais de Manaus, AM. 2013. Tese (Doutorado em Fisiopatologia) – Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 109 f., 2013.
- BAGCHI, D.; SEN, C.K.; RAY, S.D.; DAS, D.K.; BAGCHI, M.; PREUSS, H.G.; VINSON, J.A. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Research*, v. 523–524, p. 87–97, 2003.
- BALANDRIN, M.F.; KINGHORN, A.D.; FARNSWORTH, N.R. Plant-derived natural products in drug discovery and development. An overview. In: *Human Medicinal Agents from Plants*, ACS Symposium Series 534, 1993, Washington, USA, American Chemical Society ISBN 0-8412-2705-5, 1993, p.2-12.
- BALNOKIN, Y.; MYASOEDOV, N.; POPOVA, L.; TIKHOMIROV, A.; USHAKOVA, S.; LASSEUR, C.; GROS, J.B. Use of halophytic plants for recycling NaCl in human liquid waste in a bioregenerative life support system. *Advances in Space Research*, v. 46, p. 768–74, 2010.
- BARATA, L.E.S.; QUEIROZ, S.R.R. *Contribuição Efetiva do PADCT para o Aproveitamento Econômico Sustentável da Biodiversidade*. Campinas: MCT/PADCT/PGCT, 1995.
- BARBEHENN, R.V. JONES, C.P.; HAGERMAN, A.E.; KARONEN, M.; SALMINEN, J.P. Ellagitannins have greater oxidative activities than condensed tannins and galloyl glucoses at high pH: Potential Impact on Caterpillars. *Journal of Chemical Ecology*, v. 32, p. 2253-67, 2006.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como fazer Experimentos*. 3. Ed., Campinas: Ed. da UNICAMP, 2007, cap. 7, p. 363-400.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2. ed., Campinas: Ed. Da Unicamp, 2002, p. 309-332.
- BATISTÃO, D.W.F. Epidemiologia e fatores de risco associados à colonização por VRE e MRSA em uma unidade de Terapia intensiva de adultos. 2010. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia) – Programa de Pós –graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 69 f., 2010.
- BAUMBERGER, T.; AFFRE, L.; CROZE, T.; MESTÉARD, F. Habitat requirements and population structure of the rare endangered *Limonium girardianum* in Mediterranean salt marshes. *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, v. 207, n. 4, p. 283-93, 2012.
- BEEBE, K.R.; PELL, R.J.; SEASHOLTZ, M.B. *Chemometrics: a practical guide*. New York: John Wiley & Sons, 1998.
- BENDER, E.A. Caracterização fenótica e genotípica de amostras de *Enterococcus* spp. isoladas em dois hospitais de Porto Alegre. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 78 f., 2008.
- BLAINSKI, A. Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade *in vivo* de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) – Baicuru. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 133 f., 2010.
- BLAINSKI, A.; LOPES, G.C.; 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, p. 6852–65, 2013.
- BOGAARD, A.E.; STOBBERINGH, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 14, p. 327-35, 2000.
- BOLLE, P.; MASTRANGELO, S.; PERRONE, F.; EVANDRI, M.G. Estrogen-like effect of *Cimicifuga racemosa* extract sub-fraction as assessed by *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* assays. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 107, p. 262-9, 2007.
- BORGES, C.N.; BRUNS, R.E.; ALMEIDA, A.A.; SCARMINIO, I.S. Mixture–mixture design for the fingerprint optimization of chromatographic mobile phases and extraction solutions for *Camellia sinensis*. *Analytica Chimica Acta*, v. 595, p. 28–37, 2007.

- BOTHIRAJA, C.; JOSHI, P.P.; DAMA, G.Y.; PAWAR, A.P. Enhanced plumbagin production in elicited *Plumbago indica* hairy root cultures. *European Journal of Integrative Medicine*, v. 3, n. 1, p. 39-42, 2011.
- BOTHIRAJA, C.; PAWAR, A.P.; DAMA, G.Y.; JOSHI, P.P.; SHAIKN, K.S. Rapid method for isolation of plumbagin, an alternative medicine from roots of *Plumbago zeylanica*. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 66, n. 1, p. 35-42, 2012.
- BRAKSTAD, O.G.; MAELAND, J.A. Mechanisms of methicillin resistance in staphylococci. *APMIS*, v. 105, p. 264-76, 1997.
- BRAIOS, A. Estudo de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) por técnicas genotípicas e fenotípicas. 2005. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 102 f. 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Decreto n. 5.813 de 22.6.2006. Dispõe sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, 23.6.2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 136 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. Lista de aditivos proibidos na alimentação animal. Acessado em 06 de Fevereiro de 2016. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/aditivos-proibidos>.
- BRUIN, M.A.; RILEY, L.W. Does vancomycin prescribing intervention affect vancomycin-resistant enterococcus infection and colonization on hospitals? A systematic review. *BMC Infectious Diseases*, v. 7, n. 24, doi:10.1186/1471-2334-7-24, 2007.
- BUENZ, E.J.; BAUER, B.A.; SCHNEPPLE, D.J.; WAHNER-ROEDLER, D.L.; VANDELL, A.G.; HOWE, C.L. A randomized Phase I study of *Atuna racemosa*: A potential new anti-MRSA natural product extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 114, p. 371-6, 2007.
- BURU, A.S.; PICHKA, M.R.; NEELA, V.; MOHANDAS, K. *In vitro* antibacterial effects of Cinnamomum extracts on common bacteria found in wound infections with emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 153, p. 587-95, 2014.
- BYAPPANAHALLI, M.; NEVERS, M.; KORAJKIC, A.; STALEY, Z.R.; HARWOOD, V.J. Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Review*, v. 76, n. 4, p. 685-706, 2012.
- CAELLI, M.; PORTEOUS, J.; CARSON, C.F.; HELLER, R.; RILEY, T.V. Tea tree oil as an alternative topical decolonization agent for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Hospital Infection*, v. 46, p. 236-7, 2000.
- CAI, K.; HAGERMAN, A.E.; MINTO, R.E.; BENNICK, A. Decreased polyphenol transport across cultured intestinal cells by a salivary proline-rich protein. *Biochemical Pharmacology*, v. 71, p. 1570-80, 2006.
- CAMPOS, A.C.; ALBIERO, J.; ECKER, A.B.; KURODA, C.M.; MEIRELLES, L.E.F.; POLATO, A.P.; TOGNIM, M.C.B.; WINGETER, M.A.; TEIXEIRA, J.J.V. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: A systematic review. *American Journal of Infection Control*, In press, Corrected Proof, Available online 5 May 2016.
- CAMPOS, P.A. Perfil epidemiológico de infecções por Enterococos Resistentes à Vancomicina em Hospital Universitário com alta prevalência de pacientes colonizados. 2013. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia) – Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 73 f., 2013.
- CARDOSO, M.L.C. *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae (Baicuru): Desenvolvimento galênico de extratos. 1990. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 101 f., 1990.
- CARDOZO, V.F.; OLIVEIRA, A.G.; NISHIO, E.K.; PERUGINI, M.R.R.; ANDRADE, C.G.T.J.; SILVEIRA, W.D.; DURÁN, N.; ANDRADE, G.; KOBAYASHI, R.K.T.; NAKAZATO, G. Antibacterial activity of extracellular compounds produced by a *Pseudomonas* strain against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Annals Clinical Microbiology Antimicrobials*, 12:12, 2012.
- CARVALHO, A.C.B.; RAMALHO, L.S.; MARQUES, R.F.O.; PERFEITO, J.P.S. Regulation of herbal medicines in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 158, p. 503-6, 2014.

- CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. *Compostos fenólicos simples e heterosídicos*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007, cap. 20, p. 519-36.
- CASTILLA, P.; ECHARRI, R.; DAVALOS, A; CERRATO, F.; ORTEGA, H.; TERUEL, J.L.; LUCAS, M.F.; GOMEZ-CORONADO, D.; ORTUNO, J.; LASUNCIO, M.A. Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis patients and healthy subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, p. 252-62, 2006.
- CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 731-42, 2013.
- CHAMBERS, H.F. Meticillin-resistant Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 1, n. 2, p. 173-86, 1988.
- CHANT, S.R. *Plumbaginaceae*. In: Heywood, V. H. *Flowering plants of the world*, 2a. ed. Batsford, London, 1993.
- CHEN, Y.; HAGERMAN, A.E. Quantitative examination of oxidized polyphenol-protein complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, p.6061-7, 2004a.
- CHEN, Y.; HAGERMAN, A.E. Characterization of soluble non-covalent complexes between bovine serum albumin and β -1,2-3,4,6-penta-O-galloyl-D-glucopyranose by MALDI-TOF MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 4008-11, 2004b.
- CHEN, Z.; KONG, S.; SONG, F.; LI, L.; JIANG, H. Pharmacokinetic study of luteolin, apigenin, chrysoeriol and diosmetin after oral administration of Flos Chrysanthemi extract in rats. *Fitoterapia*, v. 83, n. 8, p. 1616-22, 2012.
- CHEN, Z.P.; SUN, J.; CHEN, H.X.; XIAO, Y.Y.; LIU, D.; CHEN, J.; CAI, H.; CAI, B.C. Comparative pharmacokinetics and bioavailability studies of quercetin, kaempferol and isorhamnetin after oral administration of *Ginkgo biloba* extracts, *Ginkgo biloba* extract phospholipid complexes and *Ginkgo biloba* extract solid dispersions in rats. *Fitoterapia*, v. 81, n. 8, p. 1045-52, 2010.
- CHO, Y.S.; OH, J.J.; O., K.H. Synergistic anti-bacterial and proteomic effect of epigallocatechin gallate on clinical isolates of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Phytomedicine*, v. 18, p. 941-6, 2011.
- CLOSE, D.C.; MCARTHUR, C.; HAGERMAN, A.E.; FITZGERALD, H. Differential distribution of leaf chemistry in eucalypt seedlings due to variation in whole-plant nutrient availability. *Phytochemistry*, v. 66, p. 215-21, 2005.
- CORREA, A.A.F. Epidemiologia molecular, fatores de risco e prognóstico de infecção por *Enterococcus* spp resistentes à vancomicina em situações de introdução recente: um estudo em dois hospitais públicos de Bauru-SP. 2014. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 90 f., 2014.
- COSTA, A.F. *Farmacognosia*. Lisboa: Editora Calouste Gilbenkian, 2002.
- COSTA, L.M.D.; SOUZA, D.C.; MARTINS, L.T.F.; ZANELLA, R.C.; BRANDILEONE, M.C.C.; BOKERMANN, S.; SADER, H.S.; SOUZA, H.A. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brasil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 2, p. 160-3, 1998.
- COSTA, M. K.C.M. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Enterococcus* isoladas em hospitais da cidade do Natal/RN. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 87 f., 2012.
- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12, n. 4, p. 564-82, 1999.
- CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M.N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 31, n. 6, p. 446-67, 2010.
- D’COSTA, V.M.; KING, C.E.; KALAN, L.; MORAR, M.; SUNG, W.W.L.; SCHWARZ, C.; FROESE, D.; ZAZULA, G.; CALMELS, F.; DEBRUYNE, R.; GOLDING, G.B.; POINAR, H.N.; WRIGHT, G. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, v. 477, p. 457-61, 2011.
- DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, p.174-81, 2012.

- DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 27, p. 445-459, 1999.
- DE CANDOLLE, A. *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*. Paris, v. 12, 1848, p. 644.
- DENG, J.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H.; LI, L. Anxiolytic and sedative activities of *Passiflora edulis f. flavicarpa*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 128, p. 148-53, 2010.
- DENG, S.; WEST, B.J.; JENSEN, C.J. Simultaneous characterization and quantitation of flavonol glycosides and aglycones in noni leaves using validated HPLC-UV/Vis/MS method. *Food Chemistry*, v. 111, p. 526-9, 2008.
- DENG, Y.; FENG, Z.; YUAN, F.; GUO, J.; SUO, S.; WANG, B. Identification and functional analysis of the autofluorescent substance in *Limonium bicolor* salt glands. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 97, p. 20-7, 2015.
- DENNEHY, C.E. The use of herbs and dietary supplements in gynecology: an evidence-based review. *Journal of Midwifery & Women's Health*, v. 51, n. 6, p. 402-9, 2006.
- DICIAULA, M.C. Desenvolvimento de metodologia e validação de doseamento de polifenóis totais de extratos da casca de *Schinus terebinthifolius* RADDI. 2012. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 99 f., 2012.
- DING, G.; ZHANG, D.; YU, Y.; ZHAO, L.; ZHANG, B. Phylogenetic relationship among related genera of Plumbaginaceae and preliminary genetic diversity of *Limonium sinense* in China. *Gene*, v. 506, n. 2, p. 400-3, 2012.
- DU, Q.; LI, B. Identification of antioxidant compounds of *Mucuna sempervirens* by high-speed counter-current chromatographic separation–DPPH radical scavenging detection and their oestrogenic activity. *Food Chemistry*, v. 131, n. 4, p. 1181-6, 2012.
- DUAN, K.; YUAN, Z.; GUO, W.; MENG, Y.; CUI, Y.; KONG, D.; ZHANG, L.; WANG, N. LC–MS/MS determination and pharmacokinetic study of five flavone components after solvent extraction/acid hydrolysis in rat plasma after oral administration of *Verbena officinalis* L. extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 135, n. 2, p. 201-8, 2011.
- DUHAZÉ, C.; GOUZERH, G.; GAGNEUL, D.; LARHER, F.; BOUCHEREAU, A. The conversion of spermidine to putrescine and 1,3-diaminopropane in the roots of *Limonium tataricum*. *Plant Science*, v. 163, p. 639-46, 2002.
- DUHAZÉ, C.; GAGNEUL, D.; LEPORT, L.; LARHER, F.R.; BOUCHEREAU, A. Uracil as one of the multiple sources of β -alanine in *Limonium latifolium*, a halotolerant β -alanine batatine accumulating Plumbaginaceae. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 41, p. 993-8, 2003.
- EATON, T.J.; GASSON, M.J. A variant enterococcal surface protein Esp_{fm} in *Enterococcus faecium*; distribution among food, commensal, medical, and environmental isolates. *FEMS Microbiology Letters*, v. 216, p. 269-75, 2002.
- EERDUNBAYAER; ORABI, M.A.A.; AOYAMA, H.; KURODA, T.; HATANNO, T. Structures of Two New Flavonoids and Effects of Licorice Phenolics on Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Species. *Molecules*, v. 19, n. 4, p. 3883-97, 2014.
- ENGLER, A. *Syllabus der Pflanzenfamilien*. Berlin, Borntraeger, v. 2, 1964, p. 394-6.
- ERIKSSON, L.; JOHANSSON, E.; WIKSTRÖM, C. Tutorial: Mixture design – design generation, PLS analysis, and model usage. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 43, p. 1-24, 1998.
- ESTRUCH, R.; SACANELLA, E.; BADIA, E.; ANTÚNEZ, E.; NICOLÁS, J.M.; FERNÁNDEZ-SOLÁ, J.; ROTILIO, D.; GAETANO, G.; RUBIN, E.; URBANO-MÁRQUEZ, A. Different effects of red wine and gin consumption on inflammatory biomarkers of atherosclerosis: a prospective randomized crossover trial effects of wine on inflammatory markers. *Atherosclerosis*, n. 175, p. 117–123, 2004.
- EUZÉBY, J.P. LPSN-List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Acessado em 04 de Fevereiro de 2016. Disponível em: <http://www.bacterio.net>.
- FARAL-TELLO, P.; MIRAZO, S.; DUTRA, C.; PÉREZ, A.; GEIS-ASTEGGIANTE, L.; FRABASILE, S.; KONCKE, E.; DAVYT, D.; CAVALLARO, L.; HEINZEN, H.; ARBIZA, J. Cytotoxic, virucidal, and

- antiviral activity of South American plant and algae extracts. *Scientific World Journal*, v. 2012, p. 1–5, 2012.
- FARIA, R.C.B. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus*. 2008. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Pós-graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 37 f., 2008.
- FARNSWORTH, N.R.; AKERELE, O.; BINGEL, A.S.; SOEJARTA, D.D.; ENO, Z. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of World Health Organization*, v. 63, p. 226–230, 1985.
- FELIPE, A.M.M.; RINCÃO, V.P.; BENATI, F.J.; LINHARES, R.E.C.; GALINA, K.J.; TOLEDO, C.E.M.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P.; NOZAWA, C. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and Bovine Herpesvirus. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 6, p. 1092-1095, 2006.
- FENG, Z.; DENG, Y.; ZHANG, S.; LIANG, X.; YUAN, F.; HAO, J.; ZHANG, J.; SUN, S.; WANG, B. K⁺ accumulation in the cytoplasm and nucleus of the salt gland cells of *Limonium bicolor* accompanies increased rates of salt secretion under NaCl treatment using NanoSIMS. *Plant Science*, v. 238, p. 286-96, 2015.
- FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 3, p. 269-394, 2006.
- FERNÁNDEZ, I.C.D.; LUQUE, E.G.; MERCADO, F.G.; PEDROSA, W. Influence of temperature and salinity on the germination of *Limonium tabernense* Erben from Tabernas Desert (Almería, SE Spain). *Flora*, v. 218, p. 68-74, 2016.
- FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; SILVA, E.G.P.; SANTOS, W.N.L.; QUINTELLA, C.M.; DAVID, J.M.; ANDRADE, J.B.; BREITKREITZ, M.C.; JARDIM, I.C.S.F.; BARROS NETO, B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*, v. 1158, p. 2–14, 2007.
- FIOR, C.S.; BERTOGLIO, D.S.; GLOVACKI, B.G. Aspéctos reprodutivos e caracterização ambiental de populações de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze no sul do Brasil. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 5, p. 768-70, 2007.
- FLORA DO BRASIL; 2016. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/PrincipalUC/PrincipalUC.do?lingua=pt>. Acessado em 22 de Janeiro de 2016.
- FRACALANZZA, S.A.P. Identificação, resistência a antimicrobianos e caracterização molecular de Enterococcus isolados de alimentos. 2007. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós- graduação em Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 158 f., 2007.
- FRANZ, C.M.A.P.; HOLZAPFEL, W.H.; STILES, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, v. 47, p. 1-24, 1999.
- FREEDMAN, J.E.; PARKER III, C.; LI, L.; PERLMAN, J.A.; FREI, B.; IVANOV, V.; DEAK, L.R.; IAFRATI, M.D.; FOLTS, J. Select flavonoids and whole juice from purple grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Journal of the American Heart Association*, v. 103, p. 2792-98, 2001.
- FRIEDEN, T.R.; MUNSIFF, S.S.; LOW, D.E.; WILLEY, B.M.; WILLIAMS, G.; FAUR, Y.; EISNER, W.; WARREN, S.; KREISWIRTH, B. Emergence of vancomycin-resistant enterococci on New York City. *The Lancet*, v. 342, p. 76-9, 1993.
- GADETSKAYA, A.V.; TARAWNEH, A.H.; ZHUSUPOVA, G.E.; GEMEJIYEVA, N.G.; CANTRELL, C.L.; CUTLER, S.J.; ROSS, S.A. Sulfated phenolic compounds from *Limonium caspium*: Isolation, structural elucidation, and biological evaluation. *Fitoterapia*, v. 104, p. 80-85, 2015.
- GANGOPADHYAY, M.; DEWANJEE, S.; BHATTACHARYA, S. Antidiabetic effect of plumbagin isolated from *Plumbago zeylanica* L. root and its effect on GLUT4 translocation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 111, n. 6, p. 706-10, 2011a.
- GANGOPADHYAY, M.; DEWANJEE, S.; CHAKRABORTY, D.; BHATTACHARYA, S. Novel solvent-free gelucire extract of *Plumbago zeylanica* using non-everted rat intestinal sac method for improved therapeutic efficacy of plumbagin. *Industrial Crops and Products*, v. 33, n. 2, p. 445-50, 2011b.

- GARCIA, L.M.Z.; OLIVEIRA, T.F.; SOARES, P.K.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S. Statistical mixture design — Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 103, p. 1-7, 2010.
- GASPER, A.; HOLLANDS, W.; CASGRAIN, A.; SAHA, S.; TEUCHER, B.; DAINTY, J.R.; VENEMA, D.P.; HOLLMAN, P.C.; REIN, M.J.; NELSON, R.; WILLIAMSON, G.; KROON, P.A. Consumption of both low and high (-)-epicatechin apple puree attenuates platelet reactivity and increases plasma concentrations of nitric oxide metabolites: A randomized controlled trial. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 559, p. 29-37, 2014.
- GELATTI, L.C.; BECKER, A.P.; BONAMIGO, R.R.; D'AZEVEDO, P.A. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina: disseminação emergente na comunidade *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 84, n. 5, p. 501-6, 2009.
- GENG, D.; CHI, X.; DONG, Q.; HU, F. Antioxidants screening in *Limonium aureum* by optimized on-line HPLC–DPPH assay. *Industrial Crops and Products*, v. 67, p. 492–497, 2015.
- GIEHL, M.R.; BOSCO, S.M.D.; LAFLOR, C.M.; WEBER, B. Eficácia dos flavonóides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. *Scientia Medica*, v. 17, n. 3, p. 145-55, 2007.
- GOBBO-NETO, L., LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30, 374–381. 2007.
- GOMES, L.V.P. *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina isolados no Hospital Universitário de Londrina-PR: Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, virulência e genotipagem. 2013. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 82 f., 2013.
- GOPAL, J.; MUTHU, M.; PAUL, D.; KIM, D.; CHUN, S. Bacterial activity of green tea extracts: the importance of catechin containing nano particles. *Scientific Reports*, v. 6, doi:10.1038/srep19710, 2016.
- GRAY J.R.L.E.; KELCE, W.R.; WIESE, T.; TYL, R.; GAIDO, K.; COOK, J.; KLINEFELTER, G.; DESAULNIERS, D.; WILSON, E.; ZACHAREWSKI, T.; WALLER, C.; FOSTER, P.; LASKEY, J.; REEL, J.; GIESY, J.; LAWS, S.; MCLACHLAN, J.; BRESLIN, W.; COOPER, R.; DI GIULIO, R. Endocrine screening methods workshop report: Detection of estrogenic and androgenic hormonal and antihormonal activity for chemicals that act via receptor or steroidogenic enzyme mechanisms. *Reproductive Toxicology*, v. 11, n. 5, p. 719-50, 1997.
- GRÜNWARD, J. The European Phytomedicines Market: Figures, Trends, Analyses. *HerbalGram*, v. 34, p. 60-5, 1995.
- GU, H.F.; LI, C.M.; XU, Y.J.; HU, W.; CHEN, M.; WAN, Q. Structural features and antioxidant activity of tannin from persimmon pulp. *Food Research International*, v. 41, n. 2, p. 208-217, 2008.
- GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, n. 3, p. 667-79, 2010.
- GUPTA, R.K.; KUMAR, D.; CHAUDHARY, A.K.; MAITHANI, M.; SINGH, R. Antidiabetic activity of *Passiflora incarnata* Linn. in streptozotocin-induced diabetes in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 801–6, 2012.
- HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Determination of Protein in tannin-protein precipitates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 28, p. 944-7, 1980a.
- HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Condensed tannin purification and characterization of tannin-associated proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 28, p. 947-52, 1980b.
- HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 26, n. 4, p. 809-12, 1978.
- HAGERMAN, A.E.; DEAN, R.T.; DAVIES, M.J. Radical chemistry of epigallocatechin gallate and its relevance to protein damage. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 414, p. 115-20, 2003.
- HAGERMAN, A.E.; RIEDL, K.M.; JONES, A.; SOVIK, K.N.; RITCHARD, N.T.; HARTZFELD, P.W.; RIECHEL, T.L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 1887-92, 1998.

- HAGHI, G.; HATAMI, A. Simultaneous quantification of flavonoids and phenolic acids in plant materials by a newly developed isocratic high-performance liquid chromatography approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, p. 10812-6, 2010.
- HAIR Jr., J.F.; BLACK, W.C.; BABIN, B.J.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L. *Análise multivariada de dados*. 6. ed., Porto Alegre: Bookman, 2009.
- HANSEN, A.S.; MARCKMANN, P.; DRAGSTED, L.O.; NIELSEN, I.L.F.; NIELSEN, S.E.; GRØNBÆK, M. Effect of red wine and red grape extract on blood lipids, haemostatic factors, and other risk factors for cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 59, p. 449-55, 2005.
- HANSEN, H.P.; KOCH, A.; RICHTER, R. Arzneipflanzen und Gesundheitsmarkt – Trends und Perspektiven. *Zeitschrift für Phytotherapie*, v. 27, p. 68-72, 2006.
- HARBORNE, J.B. Comparative biochemistry of the flavonoids-IV. Correlations between chemistry, pollen morphology and systematics in the family plumbaginaceae. *Phytochemistry*, v. 6, n. 10, p. 1415-28, 1967.
- HARBORNE, J.B. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall. 3.ed. 1998.
- HARBORNE, J.B.; BOARDLEY, M. Use of high-performance liquid chromatography in the separation of flavonol glycosides and flavonol sulphates. *Journal of Chromatography*, v. 299, p. 377-85, 1984.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.
- HARDY, K.; BUCKLEY, S.; COLLINS, M.J.; ESTALRRICH, A.; BROTHWELL, D.; COPELAND, L.; GARCÍA-TABERNERO, A.; GARCÍA-VARGAS, S.; RASILLA, M.; LALUEZA-FOX, C.; HUGUET, R.; BASTIR, M.; SANTAMARÍA, D.; MADELLA, M.; WILSON, J.; CORTÉS, Á.F.; ROSAS, A. Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften*, v. 99, p. 617-26, 2012.
- HARTZFELD, P.W.; FORKNER, R.; HUNTER, M.D.; HAGERMAN, A.E. Determination of hydrolysable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 1785-90, 2002.
- HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible models of action. *Journal of Natural Products*, v. 59, p. 205-215, 1996.
- HASLAM, E.; HARBONE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. *The flavonoids*. London: Chapman and Hall, v. 9, p. 505-560, 1975.
- HASLER, A.; STICHER, O. Identification and determination of the flavonoids from Ginkgo biloba by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 605, p. 41-8, 1992.
- HATANO, T.; KUSUDA, M.; HORI, M.; SHIOTA, S.; TSUCHIYA, T.; YOSHIDA, T. Theasinensin A, a tea polyphenol formed from (-)-epigallocatechin gallate, suppresses antibiotic resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Planta Medica*, v. 69, p. 984-9, 2003.
- HATANO, T.; KUSUDA, M.; INADA, K.; OGAWA, T.; SHIOTA, S.; TSUCHIYA, T.; YOSHIDA, T. Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, v. 66, p. 2047-55, 2005.
- HATANO, T.; MIYTAKE, H.; NATSUME, M.; OSAKABE, N.; TAKIZAWA, T.; ITO, H.; YOSHIDA, T. Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects. *Phytochemistry*, v. 59, p. 749-758, 2002.
- HATANO, T.; SHITANI, Y.; AGA, Y.; SHIOTA, S.; TSUCHIYA, T.; YOSHIDA, T. Phenolic constituents of Licorice. VIII. Structures of glicophenone and Glicoisoflavanone, and Effects of Licorice Phenolics on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 48, p. 1286-92, 2000.
- HATANO, T.; TSUGAWA, M.; KUSUDA, M.; TANIGUCHI, S.; YOSHIDA, T.; SHIOTA, S.; TSUCHIYA, T. Enhancement of antibacterial effects of epigallocatechin gallate, using ascorbic acid. *Phytochemistry*, v. 69, p. 3111-6, 2008.

- HATTORI, M.; KUSUMOTO, L.T.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols on glucan synthesis by glucosyl transferase from *Streptococcus mutans*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 38, p. 717-720, 1990.
- HEIDE, L. Phytotherapy in Germany: Its Role in Self-Medication and in Medical Prescribing. *Natural Medicines*, v. 50, n. 4, p. 259-64, 1996.
- HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 13, n. 10, p. 572-84, 2002.
- HENKES, W.E. Identificação de *Enterococcus* sp. e resistência a antimicrobianos em amostras de regiões costeiras da lagoa dos patos. 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 60 f., 2010.
- HERVOUERT, E.; SIMONNET, H.; GODINOT, C. Mitochondria and reactive oxygen species in renal cancer. *Biochimie*, v. 89, p. 1080-8, 2007.
- HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 23, n. 3, p. 418-24, 2004.
- HOFMANN, T.; GLABASNIA, E.; SHWARZ, B.; WISMAN, K.; GANGWER, K.; HAGERMAN, A.E. Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- β -D-glucopyranose Castalagin, and Grandinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 9503-9, 2006.
- HOLETZS, F.B.; NAKAMURA, T.U.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; TOLEDO, C.E.M.; NAKAMURA, C.V. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpeesoai*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 4, p. 397-401, 2005.
- HOLLMAN, P.C.H.; GAAG, M.V.D.; MENGELERS, M.J.B.; VAN TRIJP, J.M.P.; DE VRIES, J.H.M.; KATAN, M.B. Absorption and disposition kinetics of the dietary antioxidant quercetin in man. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 21, n. 5, p. 703-7, 1996.
- HOXHA, A.; KÄRKI, T.; GIAMBI, C.; MONTANO, C.; SISTO, A.; BELLA, A.; D'ANCONA, F. Attributable mortality of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in a prospective matched cohort study in Italy, 2012-2013. *Journal of Hospital Infection*, v. 92, p. 61-6, 2016.
- HSIEH, Y.J.; LIN, L.C.; TSAI, T.H. Determination and identification of plumbagin from the roots *Plumbago zeylanica* L. by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1083, p. 141-5, 2005.
- HSU, W.C.; CHANG, S.P.; LIN, L.C.; LI, C.L.; RICHARDSON, C.D.; LIN, C.C.; LIN, L.T. Limonium sinense and gallic acid suppress hepatitis C virus infection by blocking early viral entry. *Antiviral Research*, v. 118, p. 139-147, 2015.
- HUSSEIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, v. 26, p. 2489-2491, 1987.
- ISHIDA, K.; MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, T.U.; NAKAMURA, C.V. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 58, p. 942-949, 2006.
- ISHIDA, K.; ROZENTAL, S.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8:29, doi:10.1186/1476-0711-8-29, 2009.
- IZZOTTI, A.; BAGNIS, A.; SACCÀ, S.C. The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutation Research*, v. 612, p.105-14, 2006.
- JANHS, R.T.; CRESCENTE, A.S. Ensaios farmacológicos e clínicos com a associação do extrato fluido de *Limonium brasiliense* e N-acetil-p-aminophenol. *Trib. Pharm. Curitiba*, v. 44, p. 105-11, 1976.
- JANSSEN, K.; MENSINK, R.P.; COX, F.J.J.; HARRYVAN, J.L.; HOVENIER, R.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 67, p. 255-62, 1998.
- JOLY, A.B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. 13. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2005.

- JUNTHEIKKI, M.R.; TIITTO, R.J.; HAGERMAN, A.E. Salivary tannin-binding proteins in root vole (*Microtus oeconomus* Pallas). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 24, n. 1, p. 25-35, 1996.
- KATSIARI, M.; PANAGIOTA, G.; LIKOUSI, S.; ROUSSOU, Z.; POLEMIS, M.; VATOPOULOS, C.A.; PLATSOUKA, D.E.; MAGUINA, A. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in a Greek intensive care unit: Molecular characterisation and treatment challenges. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 3, p. 123-7, 2015.
- KEEVIL, J.G.; OSMAN, H.E.; REED, J.D.; FOLTS, J.D. Grape Juice, But Not Orange Juice or Grapefruit Juice, Inhibits Human Platelet Aggregation. *Journal of Nutrition*, p. 53-56, 2000.
- KISHORE, N.; MISHRA, B.B.; TIWARI, V.K.; TRIPATHI, V. Role of exogenous phytohormones on growth and plumbagin accumulation in *Plumbago indica* hairy roots and conservation of elite root clones via synthetic seeds. *Phytochemistry Letters*, v. 3, n. 2, p. 62-5, 2010.
- KOBAYASHI, K.; RAO, M.; KEIS, S.; RAINEY, F.A.; SMITH, J.M.B.; COOK, G.M. J. Vancomycin-Resistant Enterococci Outside the Health-Care Setting: Prevalence, Sources, and Public Health Implications. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 46, p. 405-10, 2000.
- KOFTERIDIS, D.P.; VALACHIS, A.; DIMOPOULOU, D.; MARAKI, S.; CHRISTIDOU, A.; MANTADAKIS, E.; SAMONIS, G. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization: A case-case-control study. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 20, p. 293-7, 2014.
- KOLODZIEJ, H.; KAYSER, O.; RADTKE, O.A.; KIDERLEN, A.F.; KOCH, E. Pharmacological profile of extracts of *Pelargonium sidoides* and their constituents. *Phytomedicine*, v. 10, p. 18-24, 2003.
- KOMIYAMA, E.Y. Prevalência e suscetibilidade aos antibióticos de Enterococcus spp. isolados da cavidade bucal humana. 2008. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 91 f., 2008.
- KORUL'KINA, L.M.; ZHUSUPOVA, G.E.; SCHUL'TS, E.E.; ERZHANOV, K.B. Fatty-acid composition of two Limonium plant species. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 40, n. 5, p. 417-9, 2004a.
- KORUL'KINA, L.M.; SCHUL'TS, E.E.; ZHUSUPOVA, G.E.; ABILOV, Z.A.; ERZHANOV, K.B.; CHAUDRI, M.I. Biologically active compounds from *Limonium gmelinii* and *L. popovii*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 40, n. 5, p. 465-71, 2004b.
- KROOK, M.A.; HAGERMAN, A.E. Stability of polyphenols epigallocatechin gallate and pentagalloyl glucose in a simulated digestive system. *Food Research International*, v. 49, n. 1, p. 112-6, 2012.
- KSOURI, R. WIDED, M.; HANS-WERNER, K.; CHEDLY, A. Responses of Halophytes to Environmental Stresse with Special Emphasis to Salinity. *Advances in Botanical Research*, v. 53, p. 117-45, 2010.
- KUNTZE, C. E. O. *Revisio Generum Plantarum*. Leipzig, v. 2, 1891, p. 395.
- KUO, Y.C.; LIN, L.C.; TSAI, W.J.; CHOU, C.J.; KUNG, S.H.; HO, Y.H. 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. 2854-64, 2002.
- KURUTO-NIWA, R.; ITO, T.; GOTO, H.; NAKAMURA, H.; NOZAWA, R.; TERAOKA, Y. Estrogenic activity of the chlorinated derivatives of estrogens and flavonoids using a GFP expression system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 23, n. 1, p. 121-8, 2007.
- LABORATÓRIO CIBECOL. Agoniada composto. Disponível em: <http://www.cibecol.com.br/produtos.php>. Acesso em: 01 de fevereiro de 2006.
- LAVIGNE, J.P.; BOURG, G.; BOTTO, H.; SOTTO, A. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) and urinary tract infections: study model and review of literature. *Pathologie Biologie*, v. 55, p. 460-4, 2007.
- LAWRENCE, G.H.M. *Taxonomy of vascular plants*. New York: The Macmillan Company, 1951. p. 661-2.
- LECLERCQ, R. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, p. 224-31, 2009.
- LEENER, E.; MARTEL, A.; GRAEF, E.; TOP, J.; BUTAYE, P.; HAESBROUCK, F.; WILLEMS, R.; DECOSTERE, A. Molecular analysis of human, porcine, and poultry *Enterococcus faecium* isolates and their erm(B) genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 5, p. 2766-70, 2005.

- LIANG, Q.; QIAN, H.; YAE, W. Identification of flavonoids and their glycosides by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and with diode array ultraviolet detection. *European Journal of Mass Spectrometry*, v. 11, p. 93-101, 2005.
- 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, p. 333-336, 2000.
- LIN, L.C.; YANG, L.L.; CHOU, C.J. Cytotoxic naphthoquinones and plumbagic acid glucosides from *Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry*, v. 62, p. 619-22, 2003.
- LOGT, E.M.J.; ROELOFS, H.M.J.; WOBBS, T.; NAGENGAST, F.M.; PETERS, W.H.M. High oxygen radical production in patients with sporadic colorectal cancer. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 39, p. 182-7, 2005.
- LONNI, A.A.S.G.; LONGHINI, R.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P.; SCARMINIO, I.S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Analytical Chimica Acta*, v. 719, p. 57-60, 2012.
- LOPES, G.C.; SANCHES, A.C.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; HERNANDES, L.; MELLO, J.C.P. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, p. 265-272, 2005.
- LOPES, M.S.; STUMPF, E.R.T.; CARVALHO, F.I.F. Efeito do substrato na reprodução assexuada da *Limonium brasiliense* (Boiss.) O. Kuntze. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 9, n. 4, p. 421-4, 2003.
- LOWY, K.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 111, n. 9, p. 1265-73, 2003.
- LUIZ, R.L.F.; VILA, T.V.M.; MELLO, J.C.P.; NAKAMURA, C.V.; ROZENTAL, S.; ISHIDA, K. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 15, n. 68, 2015, DOI 10.1186/s12906-015-0597-4.
- MA, G.; JIANG, X.H.; CHEN, Z.; REN, J.; LI, C.R.; LIU, T.M. Simultaneous determination of vitexin-4"-O-glucoside and vitexin-2"-O-rhamnoside from hawthorn leaves flavonoids in rat plasma by HPLC method and its application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 44, n. 1, p. 243-249, 2007.
- MA, L.Y.; LIU, R.H.; XU, X.D.; YU, M.Q.; ZHANG, Q.; LIU, H.L. The pharmacokinetics of C-glycosyl flavones of Hawthorn leaf flavonoids in rat after single dose oral administration. *Phytomedicine*, v. 17, n. 8-9, p. 640-5, 2010.
- MADEIRA, S.V.F.; RESENDE, A.C.; OGNIBENE, D.T.; SOUSA, M.A.V.; MOURA, R.S. Mechanism of the endothelium-dependent vasodilator effect of an alcohol-free extract obtained from a vinifera grape skin. *Pharmacological Research*, v. 52, p. 321-7, 2005.
- MALATHUM, K.; MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics, epidemiology and therapeutic options. *Drug Resistance Updates*, v. 2, p. 224-43, 1999.
- MANNUCCI, C.; NAVARRA, M.; CALZAVARA, E.; CAPUTI, A.P.; CALAPAI, G. Serotonin involvement in *Rhodiola rosea* attenuation of nicotine withdrawal signs in rats. *Phytomedicine*, v. 19, p. 1117-24, 2012.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. review. *Phytochemistry*, v. 24, p. 639-652, 1985.
- MARTIN, K.W.; ERNST, E. Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, p. 241-6, 2003.
- MARTINELLO, T. Desenvolvimento de comprimidos de paracetamol de 500 mg fabricados por compressão direta utilizando o planejamento estatístico de mistura. 2005. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 134 f., 2005
- MASAKI, H.; ATSUMI, T.; SAKURAI, H. Hammamelitannins as a new potent active oxygen scavenger. *Phytochemistry*, v. 37, n. 2, p. 337-342, 1994.
- MASUOKA, N.; MATSUDA, M.; KUBO, I. Characterisation of the antioxidant activity of flavonoids. *Food Chemistry*, v. 131, n. 2, p. 541-5, 2012.

- MCDONALD, L.C.; KUEHNERT, M.J.; TENOVER, F.C.; JARVIS, W. Vancomycin-Resistant Enterococci Outside the Health-Care Setting: Prevalence, Sources, and Public Health Implications. *Emerging Infectious Diseases*, v. 3, p. 311-7, 1997.
- MEDINA, J.E.; RONDINA, V.D.; COUSSIO, J.D. Phytochemical screening of Argentine plants with potencial pharmacological activity. *Planta Medica*, v. 31, n. 2, p. 136-40, 1977.
- MEDINI, F.; BOURGOU, S.; LALANCETTE, K.; SNOUSSI, M.; MKADMINI, K.; COTÉ, I.; ABDELLEY, C.; LEGAULT, J.; KSOURI, R. 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. 158-64, 2015.
- MEDINI, F.; LEGAULT, J.; PICHETTE, A.; ABDELLEY, C.; KSOURI, R. Antiviral efficacy of *Limonium densiflorum* against HSV-1 and influenza viruses. *South African Journal of Botany*, v. 92, p. 65-72, 2014a.
- MEDINI, F.; FELLAH, H.; KSOURI, R.; ABDELLEY, C. 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, p. 216-24, 2014b.
- MELO, J.O.; ENDO, T.H.; BERSANI-AMADO, L.E.; SVIDZINSKI, A.E.; BARONI, S.; MELLO, J.C.P.; BERSANI-AMADO, C.A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, n. 3, p. 465-469, 2007.
- MIGLIORANZA, B. Emprego de planejamento experimental no desenvolvimento de métodos cromatográficos na indústria farmacêutica. 2012. Dissertação (Mestre Profissional em Química) – Curso de Pós-graduação e Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 70 f., 2012.
- MONTEIRO, R. ; FARIA, A.; AZEVEDO, I.; CALHAU, C. Anti-proliferative effect of hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids is linked to their aromatase inhibiting potential. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, v. 21, p. 550, 2007.
- MOREIRA, D.L.; ENGELHARDT, R.; REIS, A.S.; SANCHES, E.M.; LEITÃO, S.G.; LEITÃO, G.G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseupiptadenia contota* (Leguminosae-Mimosoideae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, p. 124-125, 2002.
- MOURA, T.F.A.L. *Sobre o Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, o baicuru da Farm. Bras. I. 1984. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 146 f., 1984.
- MOVSUMOV, I.S.; GARAEV, E.A. Flavonoids from *Limonium meyeri*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 41, n. 3, p. 348, 2005.
- MUELLER-HARVEY, I. Analysis of hydrolysable tannins. *Animal Feed Science and Technology*, v. 91, p. 3-20, 2001.
- MUNOZ-PRICE, L.S.; POIREL, L.; BONOMO, R.A.; SCHWABER, M.; DAIKOS, G.; CORMICAN, M.; CORNGLIA, G.; GARAU, J.; GNIADKOWSKI, M.; HAYDEN, M.K.; KUMARASAMY, K.; LIVERMORE, D.M.; MAYA, J.; NORDMANN, P.; PATEL, J.; PATERSON, D.L.; PITOUT, J.; VILLEGAS, M.V.; WANG, H.; WOODFORD, N.; QUINN, J.P. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 13, n. 9, p. 785-96, 2013.
- MURAKEÖZY, E.O.; SMIRNOFF, N.; NAGY, Z.; TUBA, Z. Seasonal accumulation pattern of pinitol and other carbohydrates in *Limonium gmelini* subsp. *hungarica*. *Journal of Plant Physiology*, v. 159, p. 485-90, 2002.
- MURRAY, A.P.; RODRIGUEZ, S.; FRONTERA, M.A.; TOMAS, M.A.; MULLET, A.C. Antioxidant metabolites from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Zeitschrift-fuer-Naturforschung-Section-C-Journal-of-Biosciences*, v. 59c, p. 477-80, 2004.
- MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, n. 1, p.46-65, 1990
- MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant Enterococcal Infections. *The New England Journal of Medicine*, v. 341, p.710-21, 2000.

- NAGOSHI, C.; SHIOTA, S.; KURODA, T.; HATANO, T.; YOSHIDA, T.; KARIYAMA, R.; TSUCHIYA, T. Synergistic Effect of [10]-Gingerol and Aminoglycosides against Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Biological Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, p. 443-7, 2006.
- NASCIMENTO, G.G.F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P.C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, p.247-56, 2000.
- NATARAJAN, K.S.; NARASIMHAN, M.; SHANMUGASUNDARAM, K.R.; SHANMUGASUNDARAM, E.R.B. Antioxidant activity of a salt-spice-herbal mixture against free radical induction. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 105, p.76-83, 2006.
- NEGRO, C.; TOMASSI, L.; MICELI, A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extract. *Bioresource Technology*, v. 87, p. 41-44, 2003.
- NETTO, E.M.; SHUQAIR, N.S.M.S.A.Q.; BALBINO, E.E.; CARVALHO, A.C.B. Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos. *Revista Fitos*, v. 1, n. 3, p. 9-17, 2006.
- NISBET, L.J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? *Current Opinion in Biotechnology*, n. 8, p. 708-712, 1997.
- NY, P.; NIEBERG, P.; WONG-BERINGER, A. Impact of carbapenem resistance on epidemiology and outcomes of nonbacteremic *Klebsiella pneumoniae* infections. *American Journal of Infection Control*, v. 43, p. 1076-80, 2015.
- OHNO, S.; MATSUMOTO, N.; WATANABE, M.; NAKAJIN, S. Flavonoid inhibition of overexpressed human 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 88, n. 2, p. 175-82, 2004.
- OJOE, E. Otimização de comprimidos matriciais de liberação prolongada de teofilina aplicando o planejamento estatístico de mistura. 2008. Tese (Doutor em Farmácia) – Curso de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 100 f., 2008.
- OKAMURA, S.; NISHIYAMA, E.; YAMAZAKI, T.; OTSUKA, N.; TANIGUCHI, S.; OGAWA, W.; HATANO, T.; TSUCHIYA, T.; KURODA, T. Action mechanism of 6,6'-dihydroxythiobinupharidine from *Nuphar japonicum*, which showed anti-MRSA and anti-VRE activities. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1850, p. 1245-52, 2015.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. *Phytochemistry*, v. 32, p. 507-521, 1993.
- OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. New methods of analysing tannins. *Journal of Natural Products*, v. 52, p. 1-31, 1989.
- OLIVEIRA, W.L.M. Estudo de amostras de *Staphylococcus* spp isolados de infecções nosocomial da cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 64 f., 2009.
- OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMATANI, A.; SOBUE, S.; FIJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with *Streptococcus mutans*. *Caries Research*, v. 27, p. 124-129, 1993.
- OSAKABE, M.; NATSUME, M.; ADACHI, T.; YAMAGISSHI, M.; HIRANO, R.; TAKIZAWA, T.; ITAKURA, M.; KONDO, K. Effects of cacao liquor polyphenols on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidation in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Atherosclerosis and Trombosis*, v. 7, p. 164-168, 2000.
- PAIVA, S.R.; MARQUES, S.S.; FIGUEIREDO, M.R.; KAPLAN, M.A.C. Plumbaginaleaes: a pharmacological approach. *Floresta e Ambiente*, v. 10, n. 1, p. 98-105, 2003.
- PANOSSIN, A.; WIKMAN, G.; SARRIS, J. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): Traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. *Phytomedicine*, v. 17, p. 481-93, 2010.
- PAVEZ, M. Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 125 f., 2009.

- PETERS, P.G.; ALESSIO, H.M.; HAGERMAN, A.E.; ASHTON, T.; NAGY, S.; WILEY, R.L. Short-term isometric exercise reduces systolic blood pressure in hypertensive adults: possible role of oxygen species. *International Journal of Cardiology*, v. 110, p. 199-205, 2006.
- PIETTA, P.; MAURI, P. Analysis of flavonoids in medicinal plants. *Methods in enzymology*, v. 335, p. 3-45, 2001.
- POETA, P.; ANTUNES, T.; RODRIGUES, J. *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina isolados de fezes de frangos, pombos, gamos e ratos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 3, p. 412-4, 2005.
- PRASAIN, J.K.; WANG, C.C.; BARNES, S. Mass spectrometric methods for the determination of flavonoids in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, n. 9, p. 1324-50, 2004.
- PRICE, M.L.; HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G. Tannin content of cowpeas, chickpeas, pigeon peas, and mung beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 28, p. 459-61, 1980.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 3396-3402, 2000.
- QIN, Y.; XIA, M.; MA, J.; HAO, Y.T.; LIU, J.; MOU, H.Y.; CAO, L.; LING, W.H. Anthocyanin supplementation improves serum LDL- and HDL-cholesterol concentrations associated with the inhibition of cholesteryl ester transfer protein in dyslipidemic subjects. *American Journal Clinical Nutrition*, doi: 10.3945/ajcn.2009.27814, 2009.
- QUAVE, C.L.; PLANO, L.R.W.; PANTUSO, T.; BENNETT, B.C. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 118, p. 418-28, 2008.
- RAGONESE, A.E.; MILANO, V.A. *Vegetales y sustancias tóxicas de La flora Argentina*. In: *Enciclopedia Argentina de agricultura y Jardinería*. ACME, Buenos Aires, 1984, p. 17, 234.
- REIS, M.S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. *Diversidade e domesticação de plantas medicinais*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007, cap. 24, p. 615-56.
- REPOLLÉS, C.; HERRERO-MARTÍNEZ, J.M.; RÀFOLS, C. Analysis of prominent flavanoid aglycones by high-performance liquid chromatography using a monolithic type column. *Journal of Chromatography A*, v. 1131, p. 51-7, 2006.
- RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.
- RIEDL, K.M.; HAGERMAN, A.E. Tannin-protein complexes as radical scavengers and radical sinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4917-23, 2001.
- ROCHA, K.R. Análise genotípica e fenotípica de *Enterococcus* spp. provenientes de amostras clínicas e de alimento. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 70 f., 2012.
- RODRIGUES, M.J.; NEVES, V.; MARTINS, A.; RAUTER, A. P.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J.M.F.; VARELA, J.; BARREIRA, L.; CUSTÓDIO, L. *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. 322-9, 2016.
- RODRIGUES, M.J.; SOSZYNSKI, A.; MARTINS, A.; RAUTER, A. P.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J.M.F.; VARELA, J.; BARREIRA, L.; CUSTÓDIO, L. Unravelling the antioxidant potential and the phenolic composition of different anatomical organs of the marine halophyte *Limonium algarvense*. *Industrial Crops and Products*, v. 77, p. 315-22, 2015.
- RODRIGUEZ, S.A.; VINA, M.D.; MURRAY, A.P.; LEIRO, J.M. Antiflammatory activity from *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze. *Planta Medica*, v. 77, p. 1323-3, 2011.
- ROSITO-FILHO, J. Contribuição à análise das raízes de *Limonium brasiliense* (Boiss.). Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 39 f., 1975.

- ROSS, S.A. Myricetin-3'-methyl ether-7-glucoside from *Limonium sinuatum*. *Journal of Natural Products*, v. 47, n. 5, p. 862-4, 1984.
- RUZON, F.I.; DE PAULA, S.B.; KANOSHIKI, R.L.; PEREIRA-SANTOS, J.; KERBAUY, G.; KOBAYASHI, R.K.; YAMAUCHI, L.M.; PERUGINI, M.R.; YAMADA-OGATTA, S.F. Synergistic Effect of [10]-Gingerol and Aminoglycosides against Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Journal of Microbiology*, v. 48, p. 814-21, 2010.
- SACRAMENTO, A.G. Caracterização molecular de *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina em amostras clínicas, ambientes aquáticos e alimentos. 2015. Tese (Doutorado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 112 f., 2015.
- SAHU M.C.; DUBEY, D.; RATH, S.; PANDA, T.; PADHY, R.N. Monograph: *In vitro* efficacy of 30 ethnomedicinal plant used by Indian aborígenes against 6 multidrug resistant Gram-positive pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, v. 5, n. 2, p. 136-50, 2015.
- SANCHES, A.C.C.; LOPES, G.C.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; MELLO, J.C.P. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 1, p. 1-7, 2005.
- SÁNCHEZ, J.S. Resistência a antibióticos. *Revista Latinoamericano de Microbiologia*, v. 48, n. 2, p. 105-12, 2006.
- SANCHEZ-BURGOS, J.A.; RAMIREZ-MARES, M.V.; LARROSA, M.M.; GALLEGOS-INFANTE, J.A.; GONZALEZ-LAREDO, R.F.; MEDINA-TORRES, L.; ROCHA-GUZMAN, N.E. Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species. *Industrial Crops and Products*, v. 42, p. 57– 62, 2013.
- SANDRI, A.M. *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina: Tipagem molecular, caracterização clínica e associação com mortalidade. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 85 f., 2004.
- SANTOS, A.C.C. Prevalência, virulência e sensibilidade à terapias antimicrobianas das cepas de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* isoladas de infecções endodônticas. 2014. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 92 f., 2014.
- SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; FERREIRA, B.L.A.; AFONSO, I.F.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 43, n. 6, p. 413-23, 2007.
- SANTOS, R.I. *Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007, cap. 16, p. 403-34.
- SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. *Taninos*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007, cap.24, p.615-56.
- SARMA, H.N.; MAHANTA, H.C. Effects of composite root extract on histological structures of Graffan follicle an endometrial epithelium in albino rat. *Contraception*, v. 61, p. 335-9, 2000.
- SASAKI, H.; KASHIWADA, Y.; SHIBATA, H.; TAKAISHI, Y. Prenylated flavonoids from *Desmodium caudatum* and evaluation of their anti-MRSA activity. *Phytochemistry*, v. 82, p. 136-42, 2012.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, v. 30, p. 3875-3883, 1991.
- SCARMINIO, I.S. Desenvolvimento de um sistema quimiométrico para microcomputadores e algumas aplicações. 1989. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.
- SCHEFFÉ, H. Experiments with Mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, v. 20, n. 2, p. 344-60, 1958.
- SCHEFFÉ, H. The Simplex-Centroid Design for Experiments with Mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, v. 25, n. 2, p. 235-63, 1963.

- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. *Produtos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Medicamentos*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. Ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007, cap.15, p.371-400.
- SCHMIDT, B.; RIBNICKY, D.M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 57, n. 1, p. S3–S9, 2008.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 91, p. 21-40, 2001.
- SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. *Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. 1.ed., Barueri: Ed. Manole, 2002, cap.1, 3, p. 1-40, 125-126.
- SEABRA, I.J.; BRAGA, M.E.M.; SOUSA, H.C. Statistical mixture design investigation of CO₂–Ethanol–H₂O pressurized solvent extractions from tara seed coat. *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 64, p. 9-18, 2012.
- SEIBELS, B.; LAMBERSKI, N.; GREGORY, C.R.; SLIFKA, K.; HAGERMAN, A.E. Effective use of tea to limit dietary iron available to starlings (*Sturnus vulgaris*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 34, n. 3, p. 314-6, 2003.
- SENA, M.M.; COLLINS, C.H.; COLLINS, K.E.; SCARMINIO, I.S. Aplicações de métodos quimiométricos na especiação de Cr(VI) em solução aquosa. *Química Nova*, v. 24, n. 3, p. 331-8, 2001.
- SGHIR, E.; GRAMET, G.; SUAU, A.; ROCHET, V.; POCHARST, P. DORE, J. Quantification of Bacterial Groups within Human Fecal Flora by Oligonucleotide Probe Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 5, p. 2263-6, 2000.
- SHANMUGANAYAGAM, D.; FOLTS, J. Effect of polyphenolic flavonoid compounds on platelets. *Methods in Enzymology*, v. 335, p. 369-380, 2001.
- SHI, R.; QIAO, S.; YU, D.; SHI, X.; LIU, M.; JIANG, X.; WANG, Q.; ZHANG, L. Simultaneous determination of five flavonoids from *Scutellaria Barbata* extract in rat plasma by LC–MS/MS and its application to pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, v. 879, n. 19, p. 1625-32, 2011.
- SHIMADA, H.; MIURA, K.; IMAMURA, Y. Characteristics and inhibition by flavonoids of 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase activity in mouse tissues. *Life Sciences*, v. 78, n. 25, p. 2931-6, 2006.
- SHIMADA, H.; UCHIDA, M.; OKAWARA, T.; ABE, S.; IMAMURA, Y. Inhibitory effects of flavonoids on the reduction of progesterone to 20 α -hydroxyprogesterone in rat liver. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 93, n. 1, p. 73-9, 2005.
- SILVA, R.A.D. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. 1ª Ed. São Paulo, 1926, p. 499-500.
- SILVER, L.L. Challenges of antibacterial Discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 1, p. 71-109, 2011.
- SIMÕES, C.M.O.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E.P.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. 5.ed. Porto Alegre: Universidade/UFRGS, 1996.
- SINGH, B.; SINGH, D.; GOEL, R. Dual protective effect of *Passiflora incarnata* in epilepsy and associated post-ictal depression. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 273-9, 2012.
- SKOPEC, M.M.; HAGERMAN, A.E.; KARASOW, W.H. Do salivary proline-rich proteins counteract dietary hydrolysable tannin in laboratory rats? *Journal of Chemical Ecology*, v. 30, n. 9, p. 1679-92, 2004.
- SOARES, P. K. Planejamento quimiométrico para otimização do solvente extrator e análise exploratória da impressão digital cromatográfica de *Erythrina speciosa* Andrews. 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Curso de Pós-graduação Departamento de Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 211 f., 2010.
- SONG, Y.S.; JIN, C.; JUNG, K.J.; PARK, E.H. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, n. 2–3, p. 89-95, 2002.
- SOUZA, L.M.; CIPRIANI, T.R.; SANT’ANA, C.F.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; SASSAKI, G.L. Heart-cutting two-dimensional (size exclusion x reversed phase) liquid chromatography-mass spectrometry analysis of flavonol glycosides from leaves of *Maytenus ilicifolia*. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 99-105, 2009.

- STANGE, R. Beliebtheit und Akzeptanz von Phytopharmaka bei Publikum und Verordnern. *Zeitschrift für Phytotherapie*, v. 35, p. 16-20, 2014.
- STANKOVIC, M.S.; PETROVIC, M.; GODJEVAC, D.; STEVANOVIC, Z.D. Screening inland halophytes from the central Balkan for their antioxidant activity in relation to total phenolic compounds and flavonoids: Are there any prospective medicinal plants? *Journal of Arid Environments*, v. 120 p. 26–32, 2015.
- STULL, A.J., CASH, K.C.; JOHNSON, W.D.; CHAMPAGNE, C.M.; CEFALU, W.T. Bioactives in Blueberries Improve Insulin Sensitivity in Obese, Insulin-Resistant Men and Women. *The Journal of Nutrition*. p. 1764-8, 2010.
- SUNIL, C.; DURIPANDIAN, V. AGASTIAN, P.; IGNACIMUTHU, S. Antidiabetic effect of plumbagin isolated from *Plumbago zeylanica* L. root 3 and its effect on GLUT4 translocation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology*, Article in Press, 2012.
- SURESH, V.; ASHA, V.V. Preventive effect of ethanol extract of *Phyllanthus rheedii* Wight. On D-galactosamine induced hepatic damage in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, p. 447-53, 2008.
- SZAFLIK, J.P.; RUSIN, P.; ZALESKA-ZMIJEWSKA, A.; KOWALSKI, M.; MAJSTEREK, I.; SZAFLIK, J. Reactive oxygen species promote localized DNA damage in glaucoma-iris tissues of elderly patients vulnerable to diabetic injury. *Mutation Research*, v. 697, p. 19-23, 2010.
- TABOT, P.T.; ADAMS, J.B. Salt secretion, proline accumulation and increased branching confer tolerance to drought and salinity in the endemic halophyte *Limonium linifolium*. *South African journal of Botany*, v. 94, p. 64-73, 2014.
- TAKIKAWA, M.; INOUE, S.; HORIO, F.; TSUDA, T. Dietary Anthocyanin-Rich Bilberry Extract Ameliorates Hyperglycemia and Insulin Sensitivity via Activation of AMP-Activated Protein Kinase in Diabetic Mice. *The Journal of Nutrition*, p. 527-33, 2010.
- TANEE, F.S.F.; NJAMEN, D.; NDÉ, C.B.; WANJI, J.; ZIERAU, O.; FOMUM, Z.T.; VOLLMER, G. Estrogenic effect of the ethyl-acetate extract of the stem bark of *Erythrina lysistemon* Huntch (Fabaceae). *Phytomedicine*, v. 14, p. 222-6, 2007.
- TANG, X.; GAU, J.; CHEN, J.; XU, L.; TANG, Y.; DOU, H.; YU, W.; ZHAO, X. Expression of VDAC regulated by extracts of *Limonium sinense* Ktze root against CCl4-induced liver damage. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 8, p. 204-13, 2007.
- TANG, X.; YU, F.; LIU, J., YAN, L.; DONG, M. Isolation and identification of anti-tumor polysaccharide LSP21 from *Limonium sinense* (Girard) Kuntze. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 70, p. 138-42, 2014.
- TANG, X.H.; YAN, L.F.; GAO, J.; YANG, X.L.; XU, Y.X.; GE, H.Y.; YANG, H.D. Antitumor and immunomodulatory activity of polysaccharides from the root of *Limonium sinense* Kuntze. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 51, n. 5, p. 1134-9, 2012.
- THE PLANT LIST, 2016. Acessado em 22 de Janeiro de 2016. Disponível em: www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Plumbaginaceae.
- THOMAS, V.C.; HIROMASA, Y.; HARMS, N.; THURLOW, L.; TOMICH, J.; HANCOCK, L.E. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Molecular Microbiology*, v. 74, n. 4, p. 1022-36, 2009.
- TIAN, Y.; ZOU, B.; LI, C.; YANG, J.; XU, S.; HAGERMAN, A.E. High molecular weight persimmon tannin is a potent antioxidant both *ex vivo* and *in vivo*. *Food Research International*, v. 45, n. 1, p. 26-30, 2012.
- TIKHOMIROVA, N.A.; USHAKOVA, S.A.; KUDENKO, Y.A.; GRIBOVSKAYA, I.V.; SHKLAVTSOVA, E.S.; BALNOKIN, Y.V.; POPOVA, L.G.; MYASOEDOV, N.A.; GROS, J.B.; LASSEUR, C.H. Potential of salt-accumulating and salt-secreting halophytic plants for recycling sodium chloride in human urine in bioregenerative life support systems. *Advances in Space Research*, v. 48, n. 2, p. 378-82, 2011.
- TRABELSI, N.; OUESLATI, S.; FALLEH, H.; WAFFO-TÉGUO, P.; PAPASTAMOULIS, Y.; MÉRILLON, J.M.; ABDELLY, C.; KSOURI, R. Isolation of powerful antioxidants from the medicinal halophyte *Limonium sinense*. *Food Chemistry*, v. 135, p. 1419–1424, 2012.

- TRABELSI, N.; OUESLATI, S.; KSOURI, R.; NASSRA, M.; MARCHAL, A.; KRISA, S.; ABDELLEY, C.; MERILLON, J.M.; WAFFO-TÉGUO, P. The antioxidant properties of new dimer and monomers of phenolic acid amides isolated from *Limonium guyonianum*. *Food Chemistry*, v. 146, p. 466–71, 2014.
- TYE, H. Application of statistical ‘design of experiments’ methods in drug Discovery. *Drug Discovery Today*, v. 9, p. 485-91, 2004.
- UHLEMANN, A.C.; OTTO, M.; LOWY, F.; DELEO, F.R. Evolution of community- and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 21, p. 563-74, 2014.
- VALLE, D.L.; ANDRADE, J.; PUZON, J.; CABRERA, E.C.; RIVERA, W.L. Antibacterial activities of ethanol extracts of philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 5, n. 7, p. 532-40, 2015.
- VEIGA-JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 2, p. 308-13, 2008.
- WALKER, C.; SHANKARAN, S. Extend antibiotic resistance in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: A case series. *American Journal of Infection Control*, Article in press, 2016
- WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p. 239-254, 1996.
- WANG, Y.C.; HUANG, T.L. High-performance liquid chromatography for quantification of plumbagin, an anti-*Helicobacter pylori* compound of *Plumbago zeylanica* L. *Journal of Chromatography A*, v. 1094, p. 99-104, 2005a.
- WANG, Y.C.; HUANG, T.L. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plant. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 43, p. 295-300, 2005b.
- WHITING, P.; SAVCHENKO, T.; SARKER, S.D.; REES, H.H.; DINAN, L. Phytoecdysteroids in genus *Limonium* (Plumbaginaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 26, p. 695-8, 1998.
- WHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Guidelines for the appropriate use of herbal medicines*. Manila, 1998.
- WILSON, T.C.; HAGERMAN, A.E. Quantitative determination of ellagic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 38, p. 1678-83, 1990.
- WISMAN, K.N.; PERKINS, A.A.; JEFFERS, M.D.; HAGERMAN, A.E. Accurate Assessment of the bioactivities of redox active polyphenolics in cell culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Article in press, 2008.
- YE, G.; HUANG, C. Flavonoids of *Limonium aurium*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 42, n. 2, p. 232-4, 2006.
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: Necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 147-52, 2001.
- ZAMBLÉ, A., et al. Vasoactivity, antioxidant and aphrodisiac properties of *Caesalpinia benthamiana* roots. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, p. 112-9, 2008.
- ZANELLA, R.C.; VALDERATO, F.; LOVGREN, M.; TYRREL, G.J.; BOKERMANN, S.; ALMEIDA, S.C.G.; VIEIRA, V.S.; BRANSILEONE, M.C.C. First confirmed case of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with *VanA* phenotype from Brazil: isolation from a meningitis case in São Paulo. *Microbial Drug Resistance*, v. 5, p. 159-61, 1999.
- ZERAIK, M.L.; YARIWAKE, J.H. Quantification of isoorientin and total flavonoids in *Passiflora edulis* fruit pulp by HPLC-UV/DAD. *Microchemical Journal*, v. 96, p. 86-91, 2010.
- ZERN, T.L.; WOOD, R.J.; GREENE, C.; WEST, K.L.; LIU, Y. AGGARWAL, D.; SHACHTER, N.S.; FERNANDEZ, M.L. Grape Polyphenols Exert a cardioprotective Effect in Pre- and Postmenopausal Women by Lowering Plasma Lipids and Reducing Oxidative Stress. *The Journal of Nutrition*, p. 1911-17, 2005.

- ZHANG, L.; ZOU, G. Flavanol of *Limonium bicolor*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 40, n. 6, p. 602-3, 2004.
- ZHANG, Y.J.; WU, L.; ZHANG, Q.L.; LI, J.; YIN, F.X.; YUAN, Y. Pharmacokinetics of phenolic compounds of Danshen extract in rat blood and brain by microdialysis sampling. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 136, n. 1, p. 129-36, 2011.
- ZHUSUPOVA, G.E. Amino-acid and mineral composition of substances from the aerial part and roots of *Limonium gmelinii*. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 42, n. 1, p. 123-4, 2006.
- ZHUSUPOVA, G.E.; ABIL'KAEVA, S.A. Dimeric prodelphinidins from *Limonium gmelinii* roots - III. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 42, n. 2, p. 164-8, 2006a.
- ZHUSUPOVA, G.E.; ABIL'KAEVA, S.A. Flavones from *Limonium gmelinii* - II. *Chemistry of Natural Compounds*, v.42, n. 1, p. 112-3, 2006b.
- ZHUSUPOVA, G.E.; ARTAMONOVA, N.A.; ABILOV, Z.A. Fatty-acid composition of roots of certain plant species of the genus *Limonium* – VIII. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 42, n. 5, p. 602-3, 2006a.
- ZHUSUPOVA, G.E. ARTAMONOVA, N.A.; ABILOV, Z.A.; ORAZBAEVA, Z.K. Lipophilic pigments and fattyacid from the aerial parts of certain plant species of the genus *Limonium* – VII. *Chemistry of Natural Compounds*, v. 42, n. 5, p. 512-4, 2006b.
- ZIERAU, O.; BODINET, C.; KOLBA, S.; WULF, M.; VOLLMER, G. Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 80, n. 1, p. 125-30, 2002.
- ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. *Flavonóides*. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2007, cap. 23, p. 577-614.
- Zuo, G.Y.; Wang, G.C.; Zhao, Y.B.; Xu, G.L.; Hao, X.Y.; Han, J.; Zao, Q. Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 120, n. 2, p. 287-290, 2008.

6.1 CARTA DE ACEITE DO ARTIGO CIENTÍFICO
ACCEPTANCE LETTER OF PAPER

----- Forwarded message -----

From: **Cid Aimbire de Moraes Santos (Revista Brasileira de Farmacognosia)**

<EvisSupport@elsevier.com>

Date: 2016-08-30 13:43 GMT-03:00

Subject: Your manuscript BJP_2016_122_R3 has been accepted

To: mello@uem.br

Cc: revista@sbfgnosia.org.br, pereda@unam.mx

Ref: BJP_2016_122_R3

Title: Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a HPLC-DAD technique for gallocatechin and epigallocatechin in rhizomes from *Limonium brasiliense*

Journal: Revista Brasileira de Farmacognosia

Dear Prof. Mello,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication.

Now that your manuscript has been accepted for publication it will proceed to copy-editing and production.

Thank you for submitting your work to Revista Brasileira de Farmacognosia . We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Rogelio Pereda-Miranda
Associate Editor
Revista Brasileira de Farmacognosia

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2016 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

7.1 DESCRIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

RAW MATERIAL DESCRIPTION

a. Sample of Mai/2006 (Voucher specimens under number HUEM-12151) is described in:

BLAINSKI, A. Estudos farmacognóstico, desenvolvimento de metodologia analítica, atividade hormonal, toxicidade aguda e mutagenicidade *in vivo* de *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) – Baicuru. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 133 f., 2010.

b. Sample of Mai/2010 (Voucher specimens under number HUEM-21152) is described in:

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M. Avaliação etnofarmacológica e toxicológica pré-clínica *in vivo* do extrato bruto dos rizomas de *Limonium brasiliense*. 2015. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 112 f., 2015.

c. Sample of February/2013 (Voucher specimens under number HUEM-27725): it was collected 58 kg of fresh rhizomes, which were cleaned with running water to remove soil. After drying (circular-air oven at 37 ± 2 °C), it was obtained 19.6 kg (33.8%) of material, which was milled (hammer mill Tigre ASN-5) and obtained 19.0 kg of milled herbal drug (d_{50} 0,48 mm). From of 5.0 kg of this material, it was performed the turbo-extraction with acetone:water (7:3) in the proportion of 10% (p/v) (Ultra-Turrax UTC115KT, Wilmington, NC, USA, 3000 rpm, 5 times of 5 min, temperature less than 40 °C). It was concentrated (Rota-vapor Büchi R-135) and dried (Liofilizador Christ Alpha 1-4) to obtain 1.38 kg (27.6%) of crude extract (CE). The crude extract (1.2 kg) was solubilized in water at proportion of 10% (p/v) and allow to stay in deixou-se a solução descansar em funnil of partition for ca. 20 min, until to obtain the precipitate, which was separated of partition system and liofilized (120.5 g – 10.0%). The rest of solution was partitioned with ethyl acetate (10 times the same volume of water). In the end, the aqueous and ethyl acetate phases were concentrated and liofilized to obtain the aqueous fraction (FAq – 875.0 g – 72.4%) and the ethyl acetate fraction (FAE – 125.8 g – 10.4%).

Flow chart:

